

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE COMPARATIVE DES CULTURES DE TISSUS INOCULÉES SOIT AVEC LE BACILLE TUBERCULEUX DU TYPE BOVIN

SOIT AVEC LE BACILLE BCG DE CALMETTE-GUÉRIN

par le D^r ALEXANDRE MAXIMOW,
Professeur d'anatomie à l'Université de Chicago (Etats-Unis).

I. — INTRODUCTION.

La question de la nature de la réaction de l'organisme à l'infection par le bacille tuberculeux et de l'histogénèse du tubercule reste litigieuse en dépit des nombreuses recherches effectuées.

Il est hors de doute que la morphologie du processus défensif qui a lieu lorsque le bacille tuberculeux pénètre dans le tissu est identique en principe à celle du processus que l'on connaît dans l'inflammation non spécifique. Comme je l'ai montré dans une série de travaux depuis 1902 [1], le principal rôle est joué dans les deux cas par des éléments phagocytaires non granuleux, mononucléaires, auxquels j'ai donné le nom de *poly-*

(1) Ce travail a été effectué avec l'aide de la Fondation Douglas Smith pour les recherches médicales de l'Université de Chicago.

*blast*es dans le cas de l'inflammation non spécifique, et qu'on appelle *cellules épithélioïdes* dans le processus tuberculeux. Les polyblast*es* de l'inflammation aseptique ou purulente correspondent aux cellules épithélioïdes du tubercule. Celles-ci ne sont donc qu'une forme particulière, modifiée, des polyblast*es* qui se développent sous l'influence de l'excitation spécifique dont les bacilles tuberculeux sont la source. Les polyblast*es*, comme les cellules épithélioïdes, peuvent, en fusionnant, former des cellules géantes du type de Langerhans.

Les polyblast*es* naissent de deux façons différentes (Maximow) : les uns dérivent des histiocytes locaux, mobilisés, arrondis et hypertrophiés. Les autres sont des leucocytes non granuleux, lymphocytes et monocytes, hypertrophiés. Cette origine double d'un groupe cellulaire homogène ne doit pas nous embarrasser ou nous paraître étrange. Comme je l'ai montré [2], les deux groupes de cellules, les histiocytes (éléments réticulo-endothéliaux) d'une part, et les lymphocytes et monocytes de l'autre, montrent, chez l'embryon, des relations génétiques extrêmement étroites. Une partie notable d'histiocytes, tels que les « cellules migratrices au repos » (Alfejew [3]) du tissu conjonctif, proviennent de l'immobilisation et de la fixation sur place de cellules errantes primitives (identiques aux lymphocytes et aux monocytes) du tissu conjonctif embryonnaire, du *mésenchyme*.

Tandis que l'origine des polyblast*es* aux dépens d'éléments locaux, des histiocytes, est généralement admise, l'idée de la naissance d'une partie notable d'entre eux, et même de la majorité, aux dépens de leucocytes non granuleux, émigrant des vaisseaux, rencontre beaucoup d'adversaires. En vue de donner à ce problème une solution définitive, j'ai effectué récemment une série de recherches par la méthode de la culture des tissus [4].

Dans les cultures préparées avec les leucocytes qui forment une couche blanche à la surface du sang centrifugé du lapin ou du cobaye, les lymphocytes et les monocytes se transforment d'abord en polyblast*es* typiques (macrophages), ensuite en fibroblast*es*. Les leucocytes non granuleux du sang donnent ainsi d'abord des éléments phagocytaires qui jouent un rôle de première importance dans la défense de l'organisme contre les

influences nuisibles, intérieures et extérieures. Aux stades suivants, ces polyblastes donnent naissance au tissu conjonctif ordinaire.

Le fait que, non seulement les monocytes, mais aussi les lymphocytes du sang, peuvent, dans les conditions extérieures convenables, se transformer en polyblastes, a été montré par mon élève Bloom [5], qui a pu observer dans les cultures des particules coagulées de lymphe, prise dans le conduit thoracique du lapin, la même transformation rapide des lymphocytes en polyblastes d'abord, en fibroblastes ensuite, que celle que j'avais observée dans les cultures des leucocytes du sang.

La méthode des cultures de tissus appliquée à l'étude du développement du tubercule m'a permis de montrer [6] que, dans les cultures de tissus de lapin inoculés par le bacille tuberculeux humain, cellules et microorganismes évoluent pendant longtemps parallèlement, montrant une singulière symbiose. Des tubercules typiques, constitués par des cellules épithélioïdes et des cellules géantes, se forment alors en dehors de l'organisme. Aux stades plus tardifs, ces tubercules subissent une dégénérescence semblable en tous points à la dégénérescence caséuse. J'ai pu suivre dans la culture l'origine des cellules épithélioïdes et géantes. Comme il fallait s'y attendre, j'ai constaté que, de même que les polyblastes, ces éléments ont une origine double : aux dépens d'histiocytes fixés et aux dépens de lymphocytes et de monocytes libres.

Si l'expérience est faite avec du tissu lymphoïde, la première réaction à la présence de bacilles tuberculeux est la mobilisation des histiocytes locaux, c'est-à-dire des cellules réticulaires. Elles phagocytent les bacilles et se transforment en volumineux éléments sphériques, qui sont des cellules épithélioïdes typiques. Celles-ci s'unissent en groupes compacts, en forme de tubercules, et confluent en cellules géantes polynucléaires. En même temps, les lymphocytes, qui abondent dans le tissu lymphoïde, périssent ou se transforment de même par hypertrophie en cellules épithélioïdes. Il est certain que l'usage du tissu lymphoïde présente des inconvénients. La grande variété de cellules qu'il contient permet d'objecter qu'il est peut-être difficile de distinguer exactement les lymphocytes des cellules issues des histiocytes en multiplication (cellules réticulaires).

Pour résoudre définitivement la question de la possibilité pour les leucocytes non granuleux de se transformer en cellules épithélioïdes tuberculeuses, il fallait étudier la façon dont les cultures leucocytaires se comportent vis-à-vis des bacilles tuberculeux. Je l'ai fait en 1925 [7]. Des fragments de la couche blanche leucocytaire étaient prélevés et inoculés avec des bacilles tuberculeux. Après deux ou trois jours, on constatait, ici également, la formation autour des colonies bacillaires de tubercules typiques. L'apparition dans ce cas de cellules épithélioïdes s'explique par l'hypertrophie rapide des lymphocytes et des monocytes, hypertrophie facilement visible sur le vivant. Ces expériences ont été pleinement confirmées par Timofezewsky et Benevolenskaya [8], qui ont travaillé en même temps que moi et d'une façon indépendante.

Ainsi, la méthode de culture de tissus a donné des résultats expliquant pleinement l'histogénèse de la réaction tuberculeuse. Et, tout naturellement, la question s'est posée alors de savoir comment les tissus, ainsi placés dans les conditions de vie simplifiées en dehors de l'organisme, réagissent aux bacilles tuberculeux d'origine et de virulence différentes.

Calmette et ses collaborateurs ont obtenu, à la suite de cultures prolongées du bacille tuberculeux du type bovin dans un milieu contenant de la bile de bœuf, une variété particulière du bacille tuberculeux, caractérisée par une virulence très faible, qui est largement et avec succès employée maintenant pour les vaccinations préventives, aussi bien chez le bétail que chez les enfants.

Les expériences de Calmette et de ses collaborateurs, confirmées par d'autres auteurs (Kraus et autres), ont montré que le bacille bilié, le BCG, introduit sous la peau du cobaye, provoque une infiltration locale ou, si la dose est forte, un petit abcès. Le ganglion lymphatique le plus proche se gonfle ordinairement. L'infiltration et l'abcès sont bientôt résorbés et le ganglion lymphatique reprend son aspect normal. Avec une très forte dose de bacilles, l'abcès s'ouvre, mais la plaie ainsi formée se cicatrise bientôt. Aucune infection tuberculeuse générale ne s'observe. Lorsque de fortes doses du bacille BCG sont introduites dans le sang ou dans la cavité abdominale, des tubercules peuvent se former autour des bacilles fixés dans les

tissus; ces tubercules consistent en cellules épithélioïdes et géantes ordinaires. Elles sont, toutefois, toujours résorbées au bout de huit à dix semaines, et disparaissent complètement; l'animal recouvre l'état normal. On ne constate pas, généralement, de dégénérescence caséuse. Inoculés à un cobaye neuf, ces tubercules ne provoquent pas de tuberculose.

Il est prouvé que, tant que l'organisme de l'animal contient des bacilles BCG, il manifeste une immunité plus ou moins nette vis-à-vis de l'infection par une culture virulente de bacilles tuberculeux. Il est prouvé également que, même le passage répété de BCG par le cobaye, est incapable de modifier ses propriétés biologiques et de lui rendre son ancienne virulence.

Metalnikov et Sekreteva [9] ont fait récemment l'étude histologique de la réaction de l'organisme du cobaye à l'introduction du bacille BCG. Lorsque ces microorganismes ont pénétré dans les tissus, les premiers entrés en scène sont les microphages, c'est-à-dire des leucocytes spéciaux, granuleux et à noyaux polymorphes, sortant des vaisseaux. Ils phagocytent les bacilles; ce phénomène, qui devient très intense vers la troisième ou la cinquième heure, s'atténue peu à peu et cesse complètement au sixième ou septième jour. Comme dans toute inflammation, ces leucocytes spéciaux ne font que préparer le terrain pour d'autres éléments; à la fin, ils périssent tous. Dès la fin de la première journée, et surtout au cours de la seconde, ils sont remplacés par les macrophages (dans ma terminologie, *polyblastes*), de plus en plus nombreux. Ceux-ci absorbent énergiquement, non seulement les bacilles, mais aussi les leucocytes spéciaux. Le nombre de macrophages atteint son maximum au troisième jour, pour diminuer ensuite de nouveau. Contrairement aux leucocytes spéciaux, ces éléments se montrent beaucoup plus résistants et détruisent les bacilles par digestion intracellulaire. Aux stades plus tardifs (quinze à vingt jours) on a observé une destruction extracellulaire des bacilles.

L'étude des cultures de tissus infectés par des bacilles tuberculeux permet, comme cela a été dit plus haut, d'observer pas à pas les rapports directs entre les cellules et les microorganismes. Il a paru, par conséquent, intéressant de rechercher ce qui distingue la réaction du tissu vivant cultivé en dehors de

l'organisme à l'infection par le bacille BCG de sa réaction aux bacilles du type bovin, ayant conservé leur virulence normale.

La culture du bacille BCG m'a été obligeamment envoyée par M. A. Calmette, de l'Institut Pasteur de Paris; je lui en exprime ma sincère reconnaissance. Le bacille BCG s'est développé, dans mon laboratoire, aussi bien sur pomme de terre glycéринée que sur agar glycéринé.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES DE RECHERCHES.

J'ai utilisé comme matériel de cultures le ganglion mésentérique (pancréas Asellii) du lapin. Le développement de ce tissu en dehors de l'organisme avait été étudié et décrit en détail par moi [13]. Le même tissu m'a servi, comme je l'ai dit, pour l'étude de la réaction *in vitro* du tissu de lapin au bacille tuberculeux humain [6].

Pour le présent travail, 6 séries de cultures, empruntées à 6 animaux, ont été effectuées. Chaque série comprenait 80-90 cultures, préparées par la méthode que j'ai plus d'une fois décrite [11]. L'essentiel de cette méthode consiste en ce que la goutte suspendue contenant la culture se trouve sur une petite lamelle couvre-objet arrondie, disposée à la surface d'une autre lamelle plus grande et carrée qui ferme l'excavation de la lame porte-objet, grâce à l'attraction capillaire, une goutte de la solution de Ringer étant interposée entre la lame et la lamelle.]

Comme milieu nutritif j'employais un mélange de plasma sanguin avec l'extrait tissulaire. Le plasma était toujours prélevé sur un lapin jeune, et légèrement dilué avec une solution hypotonique de Ringer, dans la proportion de 3 à 1. L'extrait était préparé par trituration d'embryons de lapin, de 1 à 2 centimètres de longueur, dans un volume cinq à six fois plus grand de solution de Ringer. Dans deux séries, j'ai employé, au lieu d'embryons, l'extrait de la moelle osseuse du lapin adulte, méthode utilisée par moi avec succès pour la culture de divers tissus de l'animal adulte. Une goutte du plasma était mélangée à une goutte d'extrait, et des fragments de tissu étaient placés dans ce mélange qui se coagulait au bout de quelques minutes. De très petits fragments de tissu (0 millim. 25 à 0 millim. 5

de diamètre) étaient placés dans chaque culture ; après coagulation, un ou deux de ces fragments étaient inoculés avec le bacille tuberculeux, par léger attouchement du bord du fragment avec l'extrémité d'un gros fil de platine rectiligne.

Le tissu ayant besoin d'un certain temps pour se développer avant que les bacilles ne se soient multipliés en grand nombre, il convient de ne l'ensemencer qu'avec un nombre aussi petit que possible de bacilles. A cet effet, une petite parcelle de la culture prise sur l'agar était, pendant quelques minutes, soigneusement triturée, dans un mortier de porcelaine stérilisé, avec 2 à 3 cent. cubes de la solution de Ringer. L'extrémité du fil de platine était plongée dans cette suspension. Dans deux séries, l'ensemencement de la culture était pratiqué trois jours après le prélèvement, pendant la première transplantation dans un nouveau milieu, au moment où le tissu avait déjà eu le temps de se développer notablement.

Dans chaque série, les cultures étaient partagées en trois lots ; les unes évoluaient sans être inoculées ; les autres étaient inoculées avec le bacille tuberculeux du type bovin, de virulence moyenne. Introduits à la dose de 1 milligr. sous la peau du cobaye, ces bacilles amenaient, un mois et demi ou deux mois plus tard, une infection tuberculeuse généralisée, avec d'innombrables tubercules dans les poumons et dans les autres organes. Le troisième groupe de cultures était inoculé avec le bacille BCG.

Les cultures étaient transplantées tous les quatre à six jours. Pour cela on découvrait la grande lamelle carrée, on enlevait la lamelle ronde avec la goutte de plasma et le tissu, on la lavait dans la solution de Ringer et on la plaçait sur une nouvelle lamelle carrée, avec une nouvelle goutte de la solution nutritive. Aux stades tardifs, lorsque les bacilles tuberculeux étaient développés au point de recouvrir le tissu, on enlevait, pendant la transplantation, certaines cultures de la lamelle ronde et on les coupait en petits fragments dans la solution de Ringer. L'excès de bacilles était enlevé par lavage et les fragments étaient reportés dans un nouveau milieu nutritif par la méthode ordinaire.

L'observation des cultures vivantes permet d'arriver à quelques notions fondamentales sur les rapports réciproques

du tissu et des bacilles et sur les transformations et le sort des différentes cellules. Mais, comme je l'ai déjà dit dans d'autres travaux, la seule observation à l'état vivant ne suffit pas pour se faire une idée exacte des processus qui ont lieu dans la culture. Il est absolument nécessaire d'employer des méthodes adéquates de fixation et de coloration. Plus encore : les cultures fixées et colorées *in toto*, dont se servent exclusivement beaucoup d'auteurs, ne peuvent non plus donner des résultats satisfaisants, parce que la culture, même la plus mince, est, à son centre, trop épaisse et insuffisamment transparente pour l'étude. C'est pourquoi les cultures fixées doivent être enlevées de la lamelle sur laquelle elles se sont développées, incluses dans la celloïdine et divisées en séries de coupes parallèles à la surface.

Pour la fixation, je me sers du Zenker-formol. Les séries de coupes, collées au porte-objet, sont colorées d'abord par la fuchsine phéniquée, ensuite, pendant vingt-quatre heures, par l'héματοxyline de Delafield très diluée, enfin par un mélange d'éosine et d'azur.

L'âge le plus avancé des cultures à ma disposition était, pour le bacille BCG, de trente jours. Dans les cultures avec bacille du type bovin, les dernières cellules meurent avant ce délai. Bien que la durée de trente jours puisse paraître trop courte, elle suffit amplement pour permettre d'acquérir une idée exacte des diverses particularités de la réaction des éléments tissulaires à l'infection par les bacilles tuberculeux d'origine différente.

III. — CULTURES DU TISSU DE GANGLION LYMPHATIQUE DE LAPIN INFECTÉES PAR LE BACILLE DU TYPE BOVIN.

Pendant les deux premiers jours, les transformations subies par le tissu lymphoïde des cultures infectées par le bacille du type bovin correspondent à ce que j'ai déjà décrit pour les cultures ordinaires, non infectées, du même tissu. Les lymphocytes émigrent en abondance dans le milieu environnant. Ceux d'entre eux qui se sont beaucoup éloignés du tissu prélevé dégèrent et se désagrègent dans les délais indiqués. Parmi ceux qui restent dans le tissu, un grand nombre se maintiennent en

vie et se trouvent dispersés par groupes au milieu de fibroblastes et de polyblastes. Les cellules réticulaires du tissu lymphoïde (histiocytes) sont mobilisées aussitôt après le transfert du tissu-semence et apparaissent sous forme de volumineux polyblastes ou macrophages amœboïdes. Elles renferment ordinairement un pigment jaune, la lipofuchsine, qui devient vert après coloration par l'hématoxyline-éosine-azur. Des mitoses s'y observent fréquemment.

Le syncytium réticulaire non différencié, qui forme la réserve cellulaire embryonnaire du tissu lymphoïde et qui, comme je l'ai décrit ailleurs (Maximow, 10-11), est en liaison étroite avec le réseau réticulaire fibrillaire, donne naissance à une multitude de cellules fusiformes qui, se multipliant énergiquement par mitose, se transforment aussi bien en nouveaux polyblastes (macrophages) amœboïdes qu'en fibroblastes typiques, allongés et munis de prolongements. Ces derniers, se mouvant dans la direction radiaire, pénètrent dans la fibrine et entourent bientôt le tissu-semence d'une auréole de tissu néoformé. Entre les fibroblastes, on voit disséminés, isolément ou par groupes, des lymphocytes et des polyblastes.

Deux ou trois jours après, à mesure que les bacilles se multiplient et que de petites colonies se forment aux bords du tissu-semence, celui-ci commence à montrer des différences nettes avec ce que l'on voit dans une culture non inoculée. Lorsqu'il s'agit du bacille du type bovin, ces particularités ont un caractère dégénératif et dépendent très probablement de quelques produits toxiques sécrétés par les bacilles tuberculeux et qui diffusent dans tous les sens dans le milieu nutritif. Cette action toxique des bacilles s'observe à des stades où aucune raison ne fait supposer que ces bacilles se désagrègent et que les produits de cette désagrégation intoxiquent les cellules. Le microscope, du moins, ne montre à ce moment, dans les colonies de bacilles, aucune modification régressive.

Les lymphocytes se montrent les plus sensibles. Dans les fragments non inoculés, et plus encore dans les cultures de contrôle, non inoculées, au même stade, ils restent non seulement vivants, mais souvent se multiplient mitotiquement et se transforment, en s'hypertrophiant, en polyblastes et macrophages.

Dans les fragments inoculés, on voit souvent, au cours des troisième et quatrième jours, les lymphocytes se réunir par groupes et commencer à s'hypertrophier; quelques-uns phagocytent même des bacilles. Mais cette évolution progressive ne va jamais jusqu'à la formation de cellules épithélioïdes. Les lymphocytes dégénèrent et périssent le plus souvent même à une distance considérable des colonies bacillaires. Cette dégénérescence progressive des lymphocytes fait qu'après six jours la plus grande partie du tissu-semence se transforme en un détritit composé de particules, les unes pâles, les autres se colorant d'une façon intense, à la manière de la chromatine.

Les histiocytes, c'est-à-dire les cellules réticulaires, sont, comme il a été dit plus haut, dans le tissu lymphoïde, la source principale de la formation de cellules épithélioïdes et géantes du tubercule. Ils occupent, au point de vue de la sensibilité à l'action nocive des bacilles, la seconde place. Pendant les premiers jours, ils sont mobilisés et transformés en gros polyblastes (macrophages), arrondis et amæboïdes, disséminés entre les lymphocytes et les fibroblastes. Ils sont particulièrement nombreux à la surface du couvre-objet, aux endroits où la fibrine est liquéfiée et le tissu est disposé en forme d'anneau autour du foyer liquéfié. Ils montrent une tendance nette à s'unir en groupes et forment même, ainsi, des cellules géantes. Cependant, en présence du bacille du type bovin, ils manifestent, dès les stades précoces, des phénomènes incontestables de dégénérescence : ils se remplissent de graisse; les mitoses sont absentes, les pseudopodes disparaissent. Lorsque, après leur mobilisation, ces cellules se dispersent et rencontrent des bacilles, ces derniers sont phagocytés. Cela donne le signal de la mort rapide et de la désagrégation des cellules. Les bacilles engloutis se répandent dans le protoplasma spumeux, plein de graisse, et continuent à s'y multiplier; leurs filaments s'enroulent en peloton, remplissent le corps cellulaire et peuvent même faire saillie au dehors. Le noyau du phagocyte se ratatine et devient foncé. Le corps cellulaire se transforme en une vésicule à parois minces, remplie d'une masse granulée de teinte pâle, avec de petits amas de pigment, des gouttelettes de graisse et des bacilles. Enfin, le contour de la cellule s'efface et il n'en reste plus qu'une petite masse résiduelle, dans laquelle

ont poussé des bacilles tuberculeux, et qui rappelle par sa forme arrondie l'ancienne cellule épithélioïde. Dans les cultures de six à dix jours, on peut trouver toujours toutes les formes de passage entre les cellules épithélioïdes spumeuses, encore vivantes, contenant ou non des bacilles, et les résidus morts que nous venons de décrire (pl. II, fig. 1 et 2).

Le syncytium embryonnaire du tissu lymphoïde et les fibroblastes auxquels il donne naissance, de même que l'endothélium des capillaires qui, habituellement, se transforme aussi en fibroblastes, sont beaucoup plus résistants vis-à-vis du bacille bovin. Après la mort de la plupart des polyblastes, on voit toujours subsister, parmi les masses résiduelles et les colonies bacillaires, des cellules fusiformes à protoplasma pâle, à noyau clair et ovale, avec des gros nucléoles; ces cellules sont disposées en réseau ou en traînées. Après six à huit jours, elles ne montrent ordinairement plus de mitoses et sont remplies de gouttelettes grasseuses. Cependant, elles ne se dégèrent pas aussi facilement que les autres espèces cellulaires décrites. Les fibroblastes ne phagocytent pas d'une façon active les bacilles tuberculeux, mais il est probable que ceux-ci peuvent pénétrer mécaniquement dans leur protoplasma. Cela n'empêche pas les fibroblastes de se maintenir en vie encore pendant quelque temps.

Aux stades suivants, après quinze jours et plus, les éléments cellulaires de la région centrale du tissu-semence se trouvent remplacés par une masse de bacilles. Les bacilles du type bovin, lorsqu'ils se développent dans les cultures de tissus, forment des traînées typiques, épaisses, enroulées en boucles et pelotonnées. Entre ces traînées, on peut quelquefois retrouver, au fond de la culture, de petits groupes ou des traînées de fibroblastes. Ceux-ci, habituellement, ne renferment pas de bacilles.

C'est à la périphérie du tissu-semence que les fibroblastes se maintiennent en vie le plus longtemps. Ici, ils peuvent continuer à croître et à se multiplier pendant un certain temps (fig. 2).

Aux stades les plus tardifs que j'ai eus à ma disposition (vingt à vingt-sept jours), les cultures inoculées de bacilles du type bovin ne renfermaient plus de cellules et consistaient uniquement en bacilles tuberculeux en riche floraison.

Puisque, dans chaque culture, on n'inoculait qu'un ou deux fragments seulement parmi ceux qui avaient été transplantés, il était habituellement possible d'observer dans la même culture les différents stades des rapports que nous venons de décrire entre les éléments tissulaires et les bacilles. Quand les dernières cellules ont déjà disparu dans les fragments inoculés, on peut encore voir, dans les autres fragments, la phagocytose des bacilles par les polyblastes et, à la périphérie, l'auréole de fibroblastes. Les fragments non inoculés lors du prélèvement s'infectaient plus tard, généralement d'eux-mêmes, pendant le déplacement de la couche liquide qui s'accumule à la surface de la culture et surtout pendant le séjour dans la solution de Ringer, lors de la transplantation.

IV. — CULTURES DU TISSU DE GANGLION LYMPHATIQUE DE LAPIN INOCULÉES AVEC LE BACILLE BCG.

Pendant un temps relativement long (les trois ou quatre premiers jours), même lorsque de jeunes colonies bacillaires sont déjà apparues au bord du tissu-semence, le tissu lymphoïde semble se développer d'une façon normale, comme dans les cultures non inoculées. Une large auréole de fibroblastes en division a le temps de se former à la périphérie du tissu-semence. Entre eux, et dans la profondeur de l'explantat, sont disséminés des amas de gros polyblastes (macrophages) d'origine réticulaire, en multiplication active. On les rencontre également en grand nombre en dehors du tissu, dans le plasma et surtout à la surface de la lamelle, dans les régions liquéfiées. Bien que de nombreux lymphocytes, surtout ceux qui se trouvent en dehors du tissu-semence, périssent habituellement, on en trouve de nombreux partout dans le tissu, disséminés, isolément ou par groupes, entre les fibroblastes et les histiocytes. Parmi eux, beaucoup ont une évolution progressive et se transforment en polyblastes, partageant ainsi, dans leurs transformations ultérieures, le sort des macrophages d'origine réticulaire. Dans les cultures préparées avec l'extrait de la moelle osseuse, on a observé dans certains cas la formation de myélocytes aux dépens de lymphocytes; je l'ai décrit antérieurement [10].

A mesure que les bacilles se multiplient aux bords du tissu-semence des phénomènes réactionnels extrêmement typiques apparaissent d'une façon plus ou moins nette. On ne les observe cependant que dans le voisinage immédiat des bacilles. Contrairement aux bacilles du type bovin, le BCG ne paraît pas exercer sur les éléments tissulaires d'action toxique à distance.

Ce sont les cellules réticulaires (histiocytes), mobilisées qui jouent le principal rôle dans la réaction des tissus. Elles se transforment en polyblastes ou macrophages amœboïdes, particulièrement volumineux, qui ressemblent tout à fait aux cellules épithélioïdes tuberculeuses ordinaires. Elles phagocytent les bacilles en les englobant en grand nombre dans leur protoplasma. Si, dans la région considérée, les bacilles ne sont pas nombreux et s'ils sont disséminés par petits groupes, ils se trouvent bientôt tous à l'intérieur des cellules et subissent, semble-t-il, en partie une désagrégation intracellulaire. On peut souvent les voir, au sein du protoplasma, se désagréger en granulations et être entourés de vacuoles digestives claires. Cette phagocytose par les cellules épithélioïdes a incontestablement un caractère actif. Les cellules s'approchent, à l'aide de leurs pseudopodes membraniformes typiques, de l'endroit où se trouvent les bacilles et entourent en groupes compacts ces derniers.

C'est ainsi que se constituent, dans un délai de six à huit jours, des amas de gros éléments épithélioïdes qui continuent à se multiplier par caryocinèse, amas qui ressemblent à des tubercules. De petites colonies compactes de BCG forment toujours des centres particulièrement prononcés, autour desquels ont lieu ces accumulations. Entre elles, on peut ordinairement découvrir des lymphocytes aux divers stades de leur transformation en cellules épithélioïdes semblables.

Les fibroblastes paraissent se comporter vis-à-vis des bacilles BCG d'une façon complètement passive. Pendant qu'aux bords du tissu-semence les cellules épithélioïdes phagocytent les bacilles de la façon indiquée et se réunissent en tubercules, les fibroblastes, qui continuent à se multiplier et à croître radiairement, forment une zone de tissu nouveau qui s'étend de plus en plus. En poursuivant sa croissance, ce tissu rencontre les colonies bacillaires disséminées à la périphérie du

tissu-semence en parties libres, en partie déjà entourées de macrophages épithélioïdes. Les fibroblastes continuent à y pénétrer plus avant, et, au bout de dix à douze jours, on voit partout, dans la vaste zone de tissu néoformé, avec ses fibroblastes et ses histiocytes, des colonies bacillaires et des tubercules disséminés.

Là où, par hasard, les polyblastes ne se trouvent pas dans le tissu en nombre suffisant, les cellules épithélioïdes ne se forment pas. Dans de tels endroits, les bacilles se multiplient sans entraves, et bientôt une colonie de bacilles, après s'être accrue, refoule les fibroblastes adjacents et occupe une cavité arrondie ou ovale, nettement dessinée. Bien que les fibroblastes se trouvent alors en contact immédiat et étroit avec les bacilles, ils ne paraissent subir aucune modification. La multiplication par mitose s'y poursuit de la façon habituelle. La pénétration des bacilles à l'intérieur de leur protoplasma, que nous décrirons plus loin, ne s'observe qu'aux stades plus tardifs.

Si, parmi les fibroblastes, il se trouve des polyblastes, ils s'acheminent tous peu à peu dans la direction des bacilles contenus dans le tissu. Si la colonie des bacilles est déjà entourée de cellules épithélioïdes, les nouveaux polyblastes se joignent à celles-ci et prennent leur aspect. Les lymphocytes qui se trouvent dans le voisinage peuvent également se transformer en cellules épithélioïdes.

Dans le tissu néoformé, ainsi que dans le tissu-semence lui-même, si des bacilles y ont été apportés lors de l'infection, il se développe, de la façon indiquée, des structures extrêmement typiques pour les cultures inoculées par le BCG, à savoir des tubercules de grosseurs diverses, depuis les plus petits jusqu'aux plus grands, discernables même à l'œil nu. Ces tubercules sont séparés par des couches de fibroblastes mêlées aux lymphocytes et aux polyblastes. A l'état vivant, ils sont immédiatement reconnaissables à leur structure caractéristique, surtout s'ils sont situés à la périphérie, où la couche du tissu néoformé est mince et transparente. Au centre, on voit la masse gris-jaunâtre et opaque des bacilles, étroitement enserrée à la périphérie par des cellules épithélioïdes transparentes et saillantes. Il est facile d'observer leur confluence avec

formation de cellules géantes et adjonction d'éléments analogues du tissu environnant.

Sur les préparations fixées et colorées, on voit que, dans les tubercules les plus petits, le nombre des bacilles est peu considérable et qu'ils sont tous englobés dans de grosses cellules épithélioïdes polygonales, qui constituent, au milieu des fibroblastes, un groupe compact nettement délimité. Les noyaux, ronds ou ovales, des cellules épithélioïdes présentent une coloration foncée et possèdent un nucléole volumineux. Le protoplasme est plus ou moins basophile et contient généralement des granulations de lipofuchsine.

Dans les tubercules plus gros, le centre est occupé par une colonie de bacilles. Contrairement aux bacilles du type bovin, la colonie de BCG présente toujours à sa surface des filaments de bacilles disposés radiairement. A ces filaments adhèrent des cellules épithélioïdes qui les englobent profondément. On trouve également, toujours dans le protoplasma, des cellules des bacilles isolés, quelquefois enfermés dans des vacuoles digestives. La présence des bacilles ne semble exercer sur les cellules aucune action nuisible, car on les voit souvent en voie de cariocynèse. A leur surface extérieure, qui fait librement saillie, on voit presque toujours sortir des pseudopodes membraniformes. Il a été possible, dans les cultures vivantes, d'observer leurs mouvements (pl. II, fig. 3 et 4).

Les tubercules les plus gros ont une forme discoïde ou lobuleuse; leur partie centrale est occupée par une accumulation considérable et massive de bacilles. A la périphérie, cette colonie présente, là aussi, des filaments de bacilles, saillant à la façon d'épines. Toute cette surface est recouverte de nombreuses cellules épithélioïdes, grandes et petites, qui se disposent à la manière des cellules épithéliales ou des ostéoblastes. Souvent on y trouve aussi des lymphocytes joints aux éléments épithélioïdes. C'est à la périphérie de tels tubercules qu'on observe le plus souvent la fusion de plusieurs cellules épithélioïdes, avec formation de cellules polynucléaires géantes. Il arrive que des polyblastes, ou même des fibroblastes isolés, pénètrent loin dans la profondeur de la colonie bacillaire.

Très souvent les colonies compactes de bacilles ne sont recouvertes de cellules épithélioïdes que d'un côté, tandis que, de

l'autre, les bacilles voisinent immédiatement avec les fibroblastes. Si le tubercule se trouve près du bord extérieur du tissu, il peut se trouver qu'une partie de la colonie reste complètement libre.

Dans les endroits où le nombre des bacilles BCG est peu considérable par rapport à celui des polyblastes présents, tous les bacilles sont absorbés par les cellules; ils sont digérés et finissent par disparaître. Au contraire, là où le rapport numérique est à l'avantage des bacilles, les cellules épithélioïdes sont impuissantes à en venir à bout. Elles continuent leur activité phagocytaire, en restant à la surface de la colonie ou en s'enfonçant loin dans sa profondeur; mais la masse centrale, compacte, de bacilles continue à croître et à s'agrandir, tandis que les cellules sont refoulées sur le côté et, en dépit de leur multiplication, forment à la surface de la colonie bacillaire une couche de plus en plus mince et de plus en plus raréfiée. Néanmoins, ici aussi, on ne peut observer d'action toxique nette du BCG sur les cellules; les éléments dégénérés sont rares parmi elles. Si les cellules épithélioïdes sont impuissantes à venir à bout des bacilles, c'est évidemment pour cette seule raison que ces derniers sont trop nombreux et que leur multiplication est plus rapide que celle des cellules. Dans mes expériences, la quantité de bactéries apportées dans la culture était presque toujours considérable par rapport à celle d'histiocytes et de lymphocytes producteurs de polyblastes et de cellules épithélioïdes. Si la quantité de bacilles était moindre, ils auraient été certainement annihilés avec le temps par les cellules. C'est ce que j'ai constaté dans quelques cultures où, lorsqu'on les observait à l'état vivant, on voyait au bord du tissu-semençe, aux stades précoces, de petits groupes de bacilles, tandis qu'aux stades plus tardifs, après fixation et coloration, les bacilles étaient complètement absents ou n'apparaissaient que sous forme de résidus finement granuleux, en partie pigmentés, au sein du protoplasma des cellules épithélioïdes.

De même que dans mes expériences antérieures sur l'infection des cultures du tissu lymphoïde du lapin avec des bacilles du type humain [6], je n'ai pu trouver ici aucune preuve convaincante de la formation des cellules épithélioïdes aux dépens des fibroblastes ou de l'endothélium vasculaire. Les tableaux

de transformation apparente des cellules fusiformes en polyblastos et cellules épithélioïdes et géantes, qu'on peut voir quelquefois à la périphérie des tubercules que je viens de décrire, doivent recevoir une explication différente : les cellules fusiformes ne sont pas ici des fibroblastes, mais des éléments embryonnaires du syncytium réticulaire, qui, comme je l'ai montré dans un autre travail, peuvent donner naissance aussi bien aux polyblastos qu'aux fibroblastes.

Aux stades tardifs, après vingt jours et plus, la multiplication des bacilles atteint un degré extrêmement élevé. A l'état vivant, on voit les colonies en croissance déchirer la couche cellulaire qui les enserre à leur surface et se répandre dans tout le tissu, en bacilles isolés, en petits groupes ou en amas sphériques plus considérables. Dans beaucoup d'endroits, ils forment des masses épaisses et compactes. Entre eux, on distingue partout des traînées de fibroblastes transparents et fusiformes. La quantité d'éléments phagocytaires amœboïdes diminue, au contraire, notablement. Sur des préparations fixées et colorées, on voit une importante couche de tissu composée de fibroblastes qui continuent à se multiplier (pl. II, fig. 5). J'ai pu y observer des mitoses, même aux stades les plus tardifs de tous ceux que j'avais à ma disposition (vingt-cinq à trente jours). Tandis qu'aux stades plus précoces les colonies bacillaires, même si elles ne sont pas recouvertes de toutes parts par les cellules épithélioïdes et géantes, sont ordinairement localisées dans certaines régions bien délimitées, entourées de fibroblastes, aux stades tardifs les bacilles remplissent tous les interstices entre les cellules. On en trouve également en masses innombrables en dehors du tissu, dans le milieu nutritif.

Bien que, comme je l'ai déjà dit, les fibroblastes ne manifestent jamais de phagocytose active vis-à-vis des bacilles, ceux-ci peuvent, aux stades plus tardifs où ils pénètrent le tissu tout entier, entrer dans le protoplasma des fibroblastes et s'y multiplier abondamment. Dans ces cas, certaines cellules fusiformes peuvent être entièrement bourrées de bacilles qui ne laissent intact que le noyau et font, en de nombreux points, saillie au dehors (pl. II, fig. 6). Malgré cela, de tels fibroblastes restent longtemps sans montrer aucun symptôme de dégéné-

rescence. Tant que le nombre de bacilles dans la cellule est peu considérable, celle-ci peut même se diviser par caryocinèse. Cela confirme mes observations antérieures sur les cultures des tissus de lapin contenant des bacilles tuberculeux humains [6].

Aux stades plus tardifs, le nombre de polyblastes (cellules épithélioïdes) observés devient minime. Quelquefois on n'en trouve aucun sur des étendues importantes. Par places, on rencontre des éléments isolés en relation avec des accumulations plus ou moins importantes de bacilles. On n'observe plus, dans les cellules épithélioïdes, de phénomènes de multiplication; certaines d'entre elles montrent des phénomènes de dégénérescence. Les lymphocytes sont à ce moment tous détruits.

Comme il a été dit plus haut pour les cultures inoculées avec le bacille du type bovin, on voit également, dans les cultures avec le BCG, que les tissus-semence qui n'ont pas été inoculés dès le début, et dont l'infection s'est faite accidentellement plus tard, peuvent ne présenter, même dans les cultures anciennes, que les premiers stades des processus réactifs décrits ci-dessus.

Pour rechercher si le bacille BCG ne subit pas, lors de sa culture simultanée avec les tissus du lapin, quelque modification de ses propriétés pathogènes, j'ai inoculé à 3 cobayes, sous la peau de la région inguinale, à chacun trois cultures de ce bacille, prises à un stade tardif et contenant des colonies disséminées dans tout le tissu. En même temps, j'inocuais à trois autres cobayes trois cultures du bacille du type bovin, au même stade de leur évolution.

Tous les cobayes ont été sacrifiés deux mois après. Ceux auxquels on avait inoculé les cultures du BCG montraient, à l'endroit de l'inoculation, un petit abcès; chez l'un des cobayes cet abcès avait présenté des ulcérations, mais était complètement cicatrisé au moment de l'examen. La paroi de l'abcès était formée de nombreux polyblastes épithélioïdes et de cellules géantes. Entre les cellules et à leur intérieur, on trouvait par places des résidus granuleux de bacilles BCG. Aucun phénomène pathologique en dehors de ce foyer local en voie de guérison n'a pu être constaté. Les trois cobayes auxquels on avait inoculé des cultures de bacilles du type bovin ont montré une tuberculose généralisée de la plupart des organes.

V. — CONCLUSIONS.

Les faits que nous avons exposés montrent que le bacille BCG se distingue du bacille du type bovin par sa virulence très faible.

Le premier rôle dans la réaction défensive contre l'infection tuberculeuse appartient aux polyblastes et aux produits de leur transformation spécifiques vis-à-vis des bacilles : les cellules épithélioïdes et les cellules géantes. Ces cellules naissent en partie des éléments locaux fixes, en partie des leucocytes non granuleux, des lymphocytes et des monocytes. Les cellules épithélioïdes phagocytent les bacilles tuberculeux, entourent leurs colonies, s'unissent en groupes et confluent en cellules géantes, pour former le *tubercule*.

Dans les cultures de tissu, les cellules épithélioïdes du lapin sont absolument impuissantes à combattre les bacilles du type bovin. Même en petit nombre, *ces bacilles exercent une action toxique sur les phagocytes, même à une certaine distance*. Les tentatives de phagocytose se terminent toujours par la dégénérescence des cellules; le plus souvent, de vrais tubercules n'ont même pas le temps de se former. Les fibroblastes sont plus résistants, mais complètement passifs. Ils peuvent, pendant quelque temps, se maintenir en vie au milieu de colonies de bacilles tuberculeux, mais ils finissent également par périr.

Par contre les bacilles BCG ne montrent, in vitro, aucune action toxique nette sur les éléments cellulaires. Les cellules épithélioïdes (polyblastes tuberculeux) les phagocytent et les détruisent en partie; en se réunissant en groupes et en entourant les colonies bactériennes, elles constituent de volumineux tubercules. La résistance des fibroblastes à l'égard du BCG est particulièrement forte. Leur multiplication se poursuit d'une façon absolument normale au voisinage étroit de volumineuses colonies. Même les lymphocytes, qui sont les éléments les plus sensibles du tissu lymphoïde, peuvent, pendant longtemps, vivre et se multiplier à proximité immédiate des bacilles.

A l'intérieur de l'organisme, la réaction des éléments polyblastiques au BCG introduit amène lentement, comme on le sait, une destruction définitive de ce bacille et la liquidation de

l'infection. Hors de l'organisme, dans une culture de tissus, le résultat est ordinairement différent. Ici aussi, une partie des bacilles est certainement détruite par les phagocytes et, si les bacilles sont peu nombreux, la culture peut arriver à s'en débarrasser. Mais, le plus souvent, le nombre de polyblastes présents n'est pas suffisant pour vaincre les bacilles, qui se multiplient rapidement parce qu'aucun apport de cellules nouvelles venant du système vasculaire n'a lieu et qu'aucune action générale de l'ensemble de l'organisme ne se fait sentir. C'est pourquoi, bien qu'il n'exerce pas d'action toxique sur les cellules, le BCG continue à se multiplier.

Pendant longtemps on observe une singulière symbiose entre le bacille BCG et les éléments tissulaires. Même *la multiplication des bacilles absorbés par les cellules ne semble pas exercer d'action néfaste sur ces dernières*. Les phénomènes sont, au total, analogues à ceux que j'avais décrits dans les cultures des tissus de lapin infectés par les bacilles du type humain qui sont, de même, peu virulents pour le lapin.

Aux stades tardifs de la vie en dehors de l'organisme, l'avantage dans la symbiose passe peu à peu du côté du bacille BCG. Les cellules épithélioïdes et géantes ne peuvent pas rivaliser dans la multiplication avec les bacilles; elles s'usent, meurent et disparaissent peu à peu. Après la disparition des cellules qui les retenaient et les encerclaient, les bacilles se répandent dans toute la culture. Cependant les fibroblastes restent en vie et continuent à se multiplier au milieu des masses compactes de bactéries, même à des stades tardifs (vingt-cinq à trente jours). Cette résistance extraordinaire des fibroblastes, même en dehors de l'organisme, vis-à-vis du bacille BCG, confirme pleinement les observations, citées plus haut, des auteurs russes qui ont toujours constaté la transformation fibreuse des tubercules provoqués par le BCG.

Malgré l'issue, défavorable pour les cellules épithélioïdes, de la symbiose en dehors de l'organisme, *le bacille BCG ne varie pas, pendant la période observée, au point de vue de la faiblesse de sa virulence. Il reste toujours incapable de provoquer chez le cobaye, en injection sous-cutanée, une infection tuberculeuse générale.*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MAXIMOW (A.). *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path.*, 1902; suppl. 5; *ibid.*, 34; 153, 1903; *ibid.*, 35, 1904; *ibid.*, 38, 1905; *ibid.*, 39, 1906.
- [2] MAXIMOW (A.). *Physiolog. Reviews*, vol. IV, 1924.
- [3] ALFEJEW. *Folia hamat. Arch.*, 1925.
- [4] MAXIMOW (A.). *Arch. russes d'Anat., d'Hist. et d'Embryol.*, 1, 1916.
- [5] BLOOM (W.). *Centr. f. allgem. Path. u. Path. Anat.*, 39, 1927.
- [6] MAXIMOW (A.). *Annales d'Anat. pathol. et d'Anat. norm. médico-chirurg.*, 3, 1926.
- [7] MAXIMOW (A.). *Journ. of. Infect. Diseases*, vol. XXXVII, 1925.
- [8] TIMOFEZEVSKY et BENEVOLENSKAYA. *Virchows Arch.*, 255, 1925.
- [9] METALNIKOV et SEKRETEVA. *Ces Annales*, 41, 1927.
- [10] MAXIMOW. *Arch. f. experim. Zeilforsch.*, 4, 1927.
- [11] MAXIMOW. *Arch. of Pathol. a. Laborat. Medic.*, vol. IV, 1927.

EXPLICATION DE LA PLANCHE II

FIG. 1. — Culture du tissu lymphoïde du lapin avec le bacille du type bovin. Stade de huit jours (1 transplantation). Phagocytose des bacilles par les cellules épithélioïdes, avec dégénérescence de ces dernières. Entre les cellules, restes de lymphocytes morts. Grossissement : 750.

FIG. 2. — Culture avec le bacille du type bovin. Stade de treize jours (3 transplantations). Le tissu est remplacé par des colonies de bacilles tuberculeux; seule, la périphérie montre une lisière étroite de fibroblastes. Grossissement : 187.

FIG. 3. — Culture avec le bacille BCG. Stade de six jours (1 transplantation). Dans la zone du tissu néoformé, composé de fibroblastes et de lymphocytes, on voit deux groupes de bacilles : un gros (à droite) et un petit (à gauche). Elles sont entamées et phagocytées par des polyblastes. Ces derniers (à droite) fusionnent et forment des cellules géantes. Grossissement : 375.

FIG. 4. — Culture avec des bacilles BCG. Stade de onze jours (2 transplantations). Dans la zone du tissu néoformé, deux colonies de BCG entourées de polyblastes se transformant en cellules épithélioïdes. Une de celles-ci montre une mitose. Grossissement : 750.

FIG. 5. — Culture avec le bacille BCG. Stade de vingt-trois jours (4 transplantations). Une partie de la couche étendue de tissu néoformé, composé maintenant exclusivement de fibroblastes. Dans ce tissu sont disséminées des colonies de BCG, grandes et petites. Parmi les bacilles on voit par endroits des restes de cellules épithélioïdes phagocytaires. Grossissement : 187.

FIG. 6. — Même culture. Bord de la couche du tissu néoformé. Les fibroblastes sont remplis de bacilles BCG. Grossissement : 750.

NOUVELLES EXPÉRIENCES
SUR LE VACCIN ANTITUBERCULEUX BCG
DOCUMENTS DE LA COMMISSION D'UKRAINE

(Suite.)

Rapporteur : professeur agrégé TZEKHNOVITZER.

(Institut bactériologique de Kharkoff, directeur :
professeur ZLATOGOROFF.)

L'étude du vaccin BCG intéresse actuellement les médecins et les vétérinaires du monde entier. Les discussions qui se sont établies à son sujet sont circonscrites à deux questions principales :

1° Les caractères biologiques de la culture BCG (sa faible virulence surtout) sont-ils stables ?

2° Cette culture possède-t-elle les qualités d'un vaccin ?

Nous ne prétendons pas répondre d'une manière définitive à ces questions, mais nous croyons utile d'apporter, à titre documentaire, les résultats des expériences que continue à poursuivre la Commission Ukrainienne.

**I. — LES PETITES DOSES DE BCG SONT-ELLES PATHOGÈNES
POUR LE COBAYE ?**

Quelques expérimentateurs ayant écrit que même de petites doses de BCG étaient virulentes, l'un de nous (D^r Kochkine) a fait les expériences relatées ci-après.

Expérience. — 16 cobayes ont reçu par groupes de 4, chacun 5 milligrammes de BCG : le groupe I par voie buccale, le groupe II par voie sous-cutanée, le groupe III par voie intrapéritonéale et le groupe IV par voie intracardiaque.

Le poids de ces animaux, au début de l'expérience, était de

210 à 310 grammes. Ils furent observés pendant des périodes variant de onze jours à six mois.

5 succombèrent à des maladies intercurrentes (septicémies) dont 2 du groupe I et 3 du groupe IV.

Les autres cobayes furent sacrifiés après des temps variant de trois mois et demi à six mois. L'examen nécropsique montra, pour les animaux du groupe II, des abcès sous-cutanés au point d'injection; pour ceux du groupe III des engorgements ganglionnaires, des nodules sur l'épiploon et un foyer pulmonaire grisâtre.

Aucun cobaye ne présentait de processus tuberculeux évolutif. Histologiquement les lésions spécifiques étaient caractérisées par la rareté des cellules géantes dans les divers organes, même dans ceux qui présentaient des apparences de tubercules.

Dans ces expériences les petites doses de BCG n'ont manifesté aucun pouvoir proprement pathogène.

II. — PEUT-ON RENDRE LE BCG VIRULENT EN L'INOCULANT DANS DES ORGANISMES INTOXIKUÉS OU AFFAIBLIS ?

Expérience (déjà citée dans ces *Annales*, mars 1927, et rappelée ici). — 22 cobayes, deux semaines avant de recevoir le BCG par diverses voies, sont inoculés sous la peau avec *un tiers de dose mortelle de toxine diphtérique*.

Quinze jours après, 9 de ces animaux reçoivent de 5 à 18 milligrammes de BCG par voie intracardiaque; 4, 25 milligrammes par voie intrapéritonéale; 9, de 25 à 50 milligrammes par voie sous-cutanée.

Leur poids, qui, au début, variait de 290 à 380 grammes, a oscillé pendant l'expérience de — 90 grammes à + 100 grammes.

La durée de leur observation a été de sept jours à quatre mois et vingt jours.

9 de ces cobayes sont morts de maladies intercurrentes (7 avaient été inoculés par voie intracardiaque, 1 par voie intrapéritonéale et 1 par voie sous-cutanée). Les autres furent sacrifiés. Aucun ne présentait de processus tuberculeux dans les viscères. Seulement chez 2 cobayes, inoculés dans le cœur, il existait un abcès du myocarde, et chez ceux inoculés sous la

peau un peu d'engorgement ganglionnaire local et général, avec légère tuméfaction de la rate.

Une autre série d'expériences fut effectuée sur 35 cobayes préalablement soumis à un régime déterminant l'avitaminose.

Expérience. — 6 de ces cobayes ont reçu 40 milligrammes de BCG intracardiaque.

5 ont reçu 100 milligrammes de BCG intrapéritonéale.

15 ont reçu de 5 à 100 milligrammes de BCG sous-cutanée.

Le poids de ces animaux, qui était au début de 280 à 410 grammes, a varié pendant la période d'observation (de sept jours à quatre mois et vingt jours) de — 100 à + 210 grammes.

17 sont morts de maladies intercurrentes. Les autres furent sacrifiés après des temps variables. L'un d'eux avait un abcès sur le péricarde. D'autres, inoculés dans le péritoine, présentaient des abcès sur l'épiploon, le foie ou la rate. Ceux injectés sous la peau avaient des abcès ouverts ou en voie de cicatrisation au voisinage immédiat du point d'inoculation. On trouvait des bacilles acido-résistants dans différents organes, mais aucune altération histologique spécifique, aucune généralisation tuberculeuse, seulement des lésions traduisant la dégénérescence et le ramollissement des tissus, dus à l'avitaminose.

Notre collègue Oboukhovsky a, de son côté, fait les expériences suivantes :

Expérience. — Sur 13 cobayes inoculés sous la peau avec 20 à 60 milligrammes de BCG, un seul a succombé à une affection intercurrente. Les 12 autres furent sacrifiés après des temps variant de quarante jours à cinq mois. Sur l'un d'eux, tué prématurément, on trouva quelques nodules isolés sur l'épiploon ; à l'autopsie des autres, aucune lésion visible.

4 lapins, inoculés sous la peau avec 20 à 80 milligrammes de BCG, furent sacrifiés trois mois et demi et cinq mois après l'injection. Aucune lésion spécifique en dehors du point d'inoculation.

4 autres lapins ont reçu, par voie intraveineuse, de 30 à 40 milligrammes de BCG ; 3 sont morts entre le onzième et le quarante et unième jour. Le quatrième fut sacrifié après trois mois et demi. Son autopsie montra de l'hépatisation pulmonaire et, dans divers organes, des bacilles acido-résistants.

Une émulsion fut préparée avec le poumon hépatisé, et injectée à 1 cobaye et à 1 lapin.

A l'autopsie de ces animaux, tués un et deux mois plus tard, on ne trouva aucune lésion tuberculeuse.

Enfin, avec l'émulsion des ganglions et de tissus infiltrés, prélevés chez un bovidé vacciné, à l'endroit même où le BCG avait été injecté, on inocula 3 cobayes et 1 lapin sous la peau. Trois mois plus tard, ces animaux furent sacrifiés. Aucun ne présentait de lésion tuberculeuse.

III. — EXPÉRIENCES SUR LES SINGES.

3 macaques (*cynomolgus*), préalablement éprouvés à la tuberculine (1 centigramme sous la peau) et reconnus indemnes, ont reçu sous la peau 50 milligrammes de BCG. On les garda en observation de cinq à treize mois. Leur poids primitif était de 3 kilogr. 400 à 4 kilogr. 270. Ils avaient déjà servi à des expériences relatives à la scarlatine, à la rougeole, etc... à l'Institut bactériologique de Kharkow.

2 de ces singes accusèrent une augmentation de poids, respectivement de 670 grammes et de 1 kilogr. 230. Le troisième, dont le poids était resté longtemps stationnaire, perdit au bout du sixième mois 470 grammes.

Ces 3 singes firent, au point d'inoculation, un abcès qui s'ouvrit aux environs du quinzième jour et qui était complètement cicatrisé après environ un mois et demi. Ils présentèrent aussi un engorgement des ganglions voisins qui ne tarda pas à s'effacer.

La perte rapide de poids du troisième singe faisait supposer l'existence d'un processus de généralisation tuberculeuse. Or, ce singe fut sacrifié à la fin du sixième mois. Son autopsie ne révéla pourtant aucune lésion macroscopiquement visible.

Des cobayes, inoculés avec l'émulsion d'un ganglion et de différents organes de ce singe, furent sacrifiés après cinq mois et demi et trouvés indemnes. Les 2 autres singes, restés en parfaite santé, seront ultérieurement éprouvés par injection d'une culture virulente.

IV. — ESSAIS D'EXALTATION DE LA VIRULENCE
PAR PASSAGES SUCCESSIFS PAR LE COBAYE ET PAR LE LAPIN.

Nous avons poursuivi, d'autre part, nos expériences en vue de rechercher s'il est possible d'exalter la virulence du BCG par passages successifs sur les animaux. Jusqu'à présent, de l'abcès sous-cutané d'un cobaye qui avait reçu le pus de l'abcès d'un cobaye précédemment inoculé avec le BCG, nous avons isolé une culture qui, injectée à 26 cobayes et à 6 lapins par diverses voies (intracardiaque, intrapéritonéale, sous-cutanée et buccale) à des doses variant de 1 à 50 milligrammes, s'est montrée totalement inoffensive après huit mois d'observation de nos animaux.

Un de ces 26 cobayes, sacrifié huit jours après inoculation sous-cutanée, a fait un abcès dont nous avons pu isoler une deuxième culture de passage de BCG. Cette deuxième culture, inoculée à son tour à 19 cobayes et à 6 lapins, n'a manifesté aucun pouvoir pathogène.

Les organes de quelques-uns de ces lapins ont servi à préparer des émulsions qui, inoculées à des cobayes neufs, sont demeurés en parfaite santé.

Nous continuons l'expérience avec une nouvelle culture isolée d'un troisième passage.

On peut, *a priori*, supposer qu'il sera peut-être possible, en continuant ainsi les passages, d'obtenir une culture capable de donner au cobaye une tuberculose transmissible. Mais ce ne serait pas un argument qu'on pourrait faire légitimement valoir à l'encontre de l'emploi du BCG comme vaccin.

V. — EFFETS DES INJECTIONS RÉPÉTÉES DE TUBERCULINE
SUR LES ANIMAUX INOCULÉS AVEC LE BCG (D^r J. Goldenberg).

Nous avons voulu rechercher si l'on pourrait rendre *in vivo* le BCG virulent en inoculant plusieurs fois (jusqu'à 10 fois à des intervalles de sept à douze jours) de 5 centigrammes à 1 décigramme de tuberculine brute de Koch à des cobayes qui avaient préalablement reçu, sous la peau, 5 milligrammes de BCG. Ces animaux sont restés en observation de trois mois et

demi à onze mois et demi. A l'autopsie d'aucun d'entre eux on n'a pu trouver de lésions tuberculeuses.

La même expérience, répétée sur des cobayes qui furent tuberculinés, les uns dès le lendemain de l'injection du BCG (5 centigrammes de tuberculine brute), les autres seulement un mois plus tard (1 décigramme), puis ensuite 9 fois à intervalles de sept à douze jours, donna le même résultat. Un de ces derniers cobayes, qui était mort quarante-huit heures après l'injection de tuberculine et dix jours après celle du BCG, présenta des lésions de pneumonie non tuberculeuse. Avec ces lésions, broyées et émulsionnées, on inocula un cobaye qui, onze mois et demi plus tard, fut sacrifié. Il était complètement indemne.

Nous n'avons donc pas réussi à renforcer *in vivo* la virulence du BCG par des injections répétées de tuberculine.¹

VI. — ESSAIS DE RESTITUTION DE LA VIRULENCE PAR INOCULATION SIMULTANÉE DU BCG ET D'UN STREPTOCOQUE.

Nos collègues Khmolnitsky et Goldenberg ont injecté à des lapins 10 milligrammes de BCG par voie intraveineuse, puis, dans la trachée, une culture âgée de vingt-quatre heures d'un streptocoque isolé des crachats d'un sujet tuberculeux. Ces lapins furent sacrifiés six ou sept mois après.

Leur autopsie ne montra aucun processus tuberculeux et l'inoculation de leurs organes, broyés et émulsionnés, à des lapins neufs, demeura sans effet.

VII. — EFFETS DU BCG SUR LES CULTURES DE CELLULES.

Kochkine s'est chargé d'étudier l'action des bacilles virulents (souche Vallée) du BCG et du bacille de la fléole sur les leucocytes du sang de lapin dans les cultures de tissus. En utilisant la méthode de Maximoff, avec deux ou trois passages en une période de sept jours, on a observé les résultats suivants :

Le BCG et la souche Vallée paraissent d'abord être tolérés par les cellules épithélioïdes. Mais, tandis que la souche Vallée, dès le cinquième jour, détermine une désagrégation des éléments cellulaires, le BCG ne produit aucun effet sem-

blable et les cellules développées à son contact continuent à se colorer normalement sans révéler de dégénérescence.

Le bacille de la fléole provoque, dès avant le troisième jour, la formation de cellules du type épithélioïde, puis, d'une façon très marquée, il s'étale sur toute la culture de tissu sans désagréger les cellules.

Il apparaît donc que, par la méthode des cultures de tissus, la souche BCG se révèle nettement inoffensive.

VIII. — ESSAIS DE VACCINATION DES PETITS RONGEURS PAR LE BCG.

Kochkine a inoculé 14 cobayes à cinq reprises, à vingt-quatre heures d'intervalle, avec, chaque fois, 2 milligrammes de BCG. Un mois après, ces animaux ont été éprouvés, en même temps que 9 témoins, par deux ingestions de 5 milligrammes chacune de tuberculose virulente Vallée, également à vingt-quatre heures d'intervalle.

6 témoins sur les 9 succombèrent en quatre à huit mois avec des lésions de tuberculose généralisée. Les 3 autres n'ont pas été infectés.

Sur les 14 vaccinés, 2 ont montré à l'autopsie quelques minimes lésions tuberculeuses. 6 étaient indemnes six à huit mois après l'épreuve. Trois avaient succombé dans le délai de trois mois et demi à des maladies intercurrentes, sans tuberculose.

3 autres cobayes furent vaccinés par une seule injection sous-cutanée de 25 milligrammes de BCG, puis infectés, deux mois et demi plus tard, en même temps que 3 cobayes témoins par voie buccale, avec 1 centigramme de culture de T. virulente (souche Vallée).

Les témoins, autopsiés après trois mois et demi, étaient tuberculeux. 2 avaient des lésions généralisées; le troisième était peu atteint.

Les cobayes vaccinés, sacrifiés après quatre mois et demi, ne présentaient que de minimes lésions.

Oboukhovsky a enfin vacciné 14 lapins très jeunes (de trois semaines), en leur faisant absorber par voie buccale, en dix jours, à intervalles de vingt-quatre heures, huit doses de

20 milligrammes et 2 doses de 24 milligrammes de BCG. Deux mois plus tard, ces 14 lapins, ainsi que 10 témoins de même âge, furent infectés, également par voie buccale, avec deux doses de 5 milligrammes de tuberculose virulente (Vallée) séparées par un intervalle de vingt-quatre heures. Sur les 10 lapins témoins, 7, autopsiés de deux à sept mois après infection, furent trouvés tuberculeux. Les 3 autres n'avaient pas de lésions visibles, mais, sur l'un d'eux, l'examen histologique fit découvrir une tuberculose du rein.

Sur les 14 vaccinés, 2 seulement présentaient quelques lésions tuberculeuses. Les 12 autres étaient indemnes.

Il se peut que ce résultat très favorable soit dû au très jeune âge des lapins utilisés.

IX. — EXPÉRIENCES SUR LES BOVIDÉS (Agalli et Oboukhovsky).

Les résultats de l'expérience sur les bovidés effectuée par la Commission Ukrainienne, et déjà précédemment rapportés en partie dans ces *Annales* (mars 1927), peuvent se résumer ainsi :

4 bovidés témoins, infectés par 5 milligrammes de T. bovine Vallée (voie intraveineuse), sont morts en vingt à quarante-sept jours, avec des lésions graves de tuberculose aux poumons et très rapide amaigrissement cachectique.

Sur 13 bovidés vaccinés au BCG, puis infectés avec la même dose de 5 milligrammes de T. bovine Vallée intraveineuse, 1 est mort le quarante-septième jour après l'épreuve, de cause étrangère à l'expérience et ne présentait à l'autopsie aucune lésion tuberculeuse.

9 autres furent sacrifiés à des dates variant de trois à douze mois après l'infection virulente. Leur autopsie ne fit découvrir par l'examen macroscopique et histologique que quelques lésions rares et bénignes dans les organes viscéraux et sur les séreuses. Cliniquement, ces animaux sont restés en parfait état ; leur poids s'accroissait régulièrement et ils ne présentaient aucun trouble de la santé.

L'autopsie de l'un de ces bovidés (n° 10) offrit un intérêt particulier : elle fit découvrir de la méningite sur le cerveau et la moelle épinière, sans qu'on ait pu observer le moindre symptôme morbide pendant la vie de l'animal.

Il reste encore 3 bovidés de cette série, vaccinés, puis infectés. Ils ne seront sacrifiés qu'après deux ans et leur santé est actuellement excellente.

Par conséquent, dans cette expérience, les bovidés vaccinés au BCG se sont montrés manifestement résistants à l'infection virulente réalisée par voie intraveineuse, alors que les témoins ont rapidement succombé.

X. — ELIMINATION DES BACILLES VIRULENTS ET DES BACILLES BCG PAR LES GLANDES MAMMAIRES DES VACHES LAITIÈRES.

En raison de son importance capitale pour les éleveurs, l'élimination des bacilles par les glandes mammaires en lactation fit l'objet de recherches attentives.

Des vaches laitières, préalablement tuberculínées et reconnues indemnes, furent infectées par voie sous-cutanée avec de fortes doses, soit de tuberculose virulente, soit de BCG. Trois semaines après l'infection, le lait de ces vaches contenait en assez grande quantité des bacilles acido-résistants. L'élimination s'est ainsi prolongée de six à sept mois. Tous les cobayes inoculés avec le lait des vaches qui avaient reçu la T. bovine virulente (Vallée) ont succombé à la tuberculose généralisée, tandis qu'aucun de ceux inoculés avec le lait des vaches qui avaient reçu le BCG ne présenta à l'autopsie la moindre trace de tuberculose.

Ainsi le BCG éliminé avec le lait ne s'est jamais montré virulent pendant la durée de l'expérience.

. . .

Signalons en terminant une expérience faite par Grigorovitch, de réinoculation de 100 milligrammes de BCG, par voie intraveineuse, à deux chevaux adultes qui avaient reçu, un an auparavant, 200 milligrammes de BCG par les voies intraveineuses et sous-cutanées. Cette réinoculation fut supportée sans le moindre incident.

CONCLUSIONS.

1° Les bacilles BCG, injectés à doses faibles ou fortes, aux cobayes sains ou affaiblis soit par l'avitaminose, soit par injections de toxine diphtérique, soit par des injections de culture de streptocoques, ne produisent que des lésions locales, à tendance régressive, et ne déterminent jamais, par les passages successifs d'animal à animal, de processus tuberculeux évolutif;

2° Les bacilles BCG introduits dans l'organisme des cobayes qu'on soumet ensuite à des injections répétées de tuberculine ne récupèrent aucune virulence et restent inoffensifs;

3° Il en est de même pour les cultures de BCG isolées après 1 ou 2 passages par l'organisme du cobaye;

4° La méthode de culture des cellules de tissus permet d'établir la non-virulence du BCG;

5° La vaccination des rongeurs de laboratoire au moyen du BCG donne des résultats relativement favorables, mais ceux-ci dépendent beaucoup du mode d'inoculation, des doses de bacilles et de l'âge des animaux utilisés pour les expériences;

6° La vaccination des bovidés par le BCG confère à ces animaux une résistance manifeste à l'infection expérimentale réalisée par voie intraveineuse;

7° Le BCG éliminé par le lait, chez la vache adulte en lactation, est dépourvu de toute virulence;

8° Ainsi que le démontrent les essais poursuivis depuis plus de deux ans par le D^r Iakins à Kharkoff, l'emploi du BCG pour la vaccination préventive des nouveau-nés est inoffensif. La très faible mortalité par tuberculose observée chez les enfants vaccinés en milieu infecté est tout en faveur de la vaccination par le procédé de Calmette-Guérin.

LA BOTRYOMYCOSE DU MOUTON (ABCÈS DU MOUTON. MALADIE CASÉEUSE)

par M. AYNAUD.

I. — HISTORIQUE.

Depuis une quarantaine d'années, un grand nombre de travaux ont été consacrés à la suppuration caséuse du mouton, et le rôle du bacille de Preisz-Nocard comme seul agent pathogène n'a pas été contesté jusqu'à ma note de 1922 (1), dans laquelle j'ai démontré qu'il s'agissait d'une suppuration analogue à la botryomycose, et due au même agent pathogène, le staphylocoque. Je me propose dans ce mémoire de rapporter les nombreuses observations et expériences réalisées depuis cinq ans. Mais, à la lecture des travaux des différents auteurs qui se sont occupés de la question, il m'est apparu que, sous les noms de suppuration caséuse, de lymphadénie caséuse, ils ont vraisemblablement décrit deux affections différentes ; c'est pourquoi, au début de ce travail, je pense qu'il est utile de bien délimiter mon sujet.

La maladie qui fait l'objet de cette étude est essentiellement la maladie des abcès : les sujets atteints sont porteurs d'abcès, plus ou moins volumineux, sans aucun trouble de l'état général : l'abcès résume toute la maladie.

Ces abcès s'observent le plus souvent dans le tissu cellulaire sous-cutané, quelquefois entre les muscles. Ils peuvent siéger dans des régions ganglionnaires (pointe de l'épaule, région inguinale, angle de la mâchoire) : dans ce cas, ils arrivent parfois, par leur développement, à s'accoler aux ganglions, mais, par de nombreuses autopsies, suivies d'examen histologiques, j'ai pu me convaincre que leur point de départ n'était pas ganglionnaire. On peut d'ailleurs en observer dans des régions

(1) *C. R. de l'Académie des Sciences* : La botryomycose du mouton, 175, 4 décembre 1922, p. 4170.

dépourvues de ganglions : c'est ainsi que, chez le béliér, il est assez fréquent d'en voir dans le tissu cellulaire du scrotum.

Leur développement est extrêmement lent, demandant des semaines et des mois pour arriver aux collections purulentes de 300 à 400 grammes. Il ne s'accompagne d'aucun trouble fonctionnel, sauf pour quelques très rares localisations : c'est ainsi que j'ai vu, chez un béliér, un abcès développé dans le tissu cellulaire rétro-pharyngien déterminer des accès de suffocation qui ont nécessité l'abatage, mais c'est là un fait tout à fait exceptionnel, et, en règle générale, l'animal ne manifeste aucun signe de souffrance. Il n'y a aucun retentissement sur l'état général. L'affection s'observe surtout chez les races sélectionnées, sur les sujets bien nourris, et en bon état. Jamais la mort ne survient du fait de l'extension de la suppuration aux viscères; on ne voit pas davantage chez les troupeaux atteints d'abcès superficiels des animaux atteints de lésions viscérales.

La gravité de l'affection au point de vue économique réside tout entière dans la dépréciation de la viande par les abcès, et non dans la mortalité qui est presque nulle, sauf dans le cas de localisations exceptionnelles, comme celle que je viens de rapporter.

Si, maintenant, nous nous rapportons aux descriptions des auteurs qui ont étudié la maladie caséuse, nous verrons qu'ils ont décrit deux types de la maladie : un type viscéral et un type limité aux *ganglions* superficiels. Dans la forme viscérale, c'est le poumon qui est principalement atteint; on se trouve en présence d'une pneumonie caséuse (1), pouvant se compliquer d'abcès de même nature du foie, de la rate, des ganglions bronchiques. La plupart des observations ont été recueillies dans les abattoirs, sur des sujets en état de maigreur, ou d'étysie complète. La maladie, qui est fréquente en Australie et en Argentine, n'a rien de commun avec celle des abcès, dont elle se différencie, autant par ses localisations complètement différentes que par la grave atteinte de l'état général.

La deuxième forme, forme périphérique, lymphadénie caséuse, si l'on en excepte certains cas graves avec forte réac-

(1) J'ai observé chez quelques brebis des pneumonies à lésions botryomycosiques, mais d'une manière tout à fait indépendante de la maladie des abcès : je reviendrai d'ailleurs sur ce sujet dans un prochain travail.

tion des ganglions ou des vaisseaux lymphatiques qui arrivent à former des cordes (Nørgaard et Mohler), correspond, tant par son aspect clinique que par son évolution, à la maladie des abcès : d'ailleurs H. Carré, dans ses travaux postérieurs à ma première note, ne fait aucune différence au point de vue clinique entre les abcès à *Coccus* et les abcès à Preisz-Nocard : mes recherches ont été au surplus effectuées dans la même région, souvent dans les mêmes exploitations, et, d'après les renseignements qui m'ont été fournis par les éleveurs et les bergers, j'ai bien étudié la même affection.

Qu'il s'agisse de la forme viscérale ou de la forme superficielle, dans tous les cas, la maladie est attribuée à un seul et même germe, le bacille de Preisz-Nocard (Preisz et Guinard, Guinard et Morey, Sivori, Cherry et Bull, Nørgaard et Mohler, H. Carré). Un seul auteur n'a pas trouvé le bacille de Preisz-Nocard : c'est G. Morel (1911) : il n'a pu constater ce germe à l'examen direct dans les abcès des moutons provenant du Dauphiné, mais il n'a pas réussi à cultiver l'agent causal : il n'a obtenu que des cultures d'impuretés, ne reproduisant pas les abcès. H. Carré ayant tout récemment (1) réclamé pour cet auteur la priorité de la découverte du « *Coccus* » de la suppuration caséuse, je reviendrai sur son travail après avoir exposé mes résultats personnels. Je crois devoir cependant faire remarquer que le mémoire de G. Morel était passé complètement inaperçu, qu'il n'en est fait aucune mention dans les nombreux travaux de H. Carré sur ce sujet, et que la première indication qui en soit donnée se trouve dans le volume de Moussu sur les maladies du mouton, 1923.

Dans une note du 17 février 1923 sur le *Coccus* pyogène du mouton (2), H. Carré, sur 20 échantillons, trouve un pus stérile, un pus à Preisz-Nocard, un pus à Preisz-Nocard et à *Coccus*, 17 fois le *Coccus* seul.

« Les caractères cultureux s'écartent notablement de celui du staphylocoque pyogène et, par conséquent, de ceux du botryocoque ». H. Carré en fait donc un germe spécial, le *Coccus*

(1) La suppuration et les microbes pyogènes des petits ruminants. *Revue générale de Médecine vétérinaire*, 36, 15 mai 1927, p. 241.

(2) Le *Coccus* pyogène du mouton. *C. R. Soc. Biologie*, 88, 17 février 1923, p. 427.

Aynaud : toutefois, il considère, malgré les chiffres de sa statistique, son rôle comme moins important que celui du Preisz-Nocard, et pense « qu'il faut soupçonner dans les formes graves, surtout chez l'agneau, l'association avec le Preisz dans la même lésion, ou dans des lésions différentes ».

Dans une deuxième note (1) sur le même sujet, je précise les caractères de culture et les propriétés du *Coccus* des abcès et, confirmant les conclusions de ma première note, je maintiens qu'il s'agit d'un staphylocoque.

Depuis H. Carré, dans une communication à la Société centrale de Médecine Vétérinaire (1923) [2] a ajouté de nouveaux cas à sa statistique : sur un total de 37 abcès, il en a vu 26 à *Coccus*, 2 à *Coccus* et à Preisz, 8 à Preisz et un stérile.

L. Cauchemez (1924) [3] sur des moutons français d'abattoir a rencontré 15 fois le Preisz, et 13 fois le staphylocoque.

Il est assez difficile d'être fixé exactement sur la fréquence relative du Preisz et du staphylocoque : les statistiques n'ont pas grande valeur, car, suivant le nombre des prélèvements effectués dans une même troupe, on peut faire pencher la balance en faveur de l'un ou de l'autre. Il n'en est pas moins certain que, dans la Beauce, le Preisz-Nocard est tout à fait exceptionnel : j'en ai observé dans cinq troupes il y a deux ans, mais depuis je n'ai pu en retrouver : dans ces troupes, j'ai rencontré des cas à *Coccus* et des cas à Preisz, mais je n'ai jamais vu jusqu'ici sur le même sujet, ni dans le même abcès, l'association des deux germes.

II. — ANATOMIE PATHOLOGIQUE.

Les abcès forment des tumeurs nettement délimitées, énucléables, sans réaction inflammatoire à leur périphérie : il n'y a pas de lymphangite. La paroi, débarrassée du pus, apparaît, quand les lésions sont suffisamment anciennes, absolument lisse, d'aspect presque séreux, sans trace de membrane pyogène.

(1) La botryomycose du mouton et de la chèvre. *C. R. Soc. de Biologie*, 89, 1923, p. 215.

(2) Sur la suppuration caséuse du mouton. *Bulletin de la Société centrale de Médecine vétérinaire*, 76, 4 octobre 1923, p. 402.

(3) Au sujet de la maladie caséuse du mouton. *Bulletin de la Société centrale de Médecine vétérinaire*, 77, 3 avril 1924, p. 174.

La consistance extraordinairement épaisse du pus a fait donner à ces abcès le nom de suppuration caséuse : il a en effet la consistance de fromage de Brie ou de Camembert : c'est un pus solide, et non liquide : il ne coule pas. Abandonné dans un récipient, à l'abri de la dessiccation, il ne sédimente pas, et se conserve pendant des mois, voire des années, dans le même état ; il n'autolyse pas : il en est de même du pus à *Preisz-Nocard* : il en va tout autrement avec le pus à bacille pyogène ; ce pus est très fluide, facile à étaler, et autolysable : ces caractères sont dus manifestement au microbe, qui est doué de propriétés protéolytiques très étendues. Cette consistance du pus de la suppuration caséuse nécessite certaines précautions pour le recueillir. J'utilise de grosses pipettes ouvertes et contenues dans des manchons stériles. La peau est brûlée au fer rouge et la pipette enfoncée dans l'abcès : en pressant sur ce dernier avec la main, on fait monter le pus dans la pipette : quand la récolte est suffisante, on la retire, et on la replace dans son manchon. Si on souffle le pus dans un tube de bouillon il en sort, sous la forme d'un tortillon, qui ne se mélange pas au liquide : il est nécessaire avec une baguette de verre de le triturer dans le bouillon pour arriver, avec beaucoup de difficulté, à obtenir une émulsion suffisamment épaisse et homogène pour faire des ensemencements.

Le pus est blanc grisâtre, assez souvent légèrement verdâtre, pistache : dans un grand nombre de cas, il contient des cristaux de leucine, de tyrosine et de cholestérine. Pour obtenir des préparations suffisamment minces, il est absolument nécessaire d'en écraser une parcelle entre deux lames, et de l'étaler en faisant glisser ces dernières l'une sur l'autre : dans ces conditions, il est impossible de faire une étude cytologique ; seuls les microbes sont conservés, mais les rapports, entre eux, et avec les autres éléments, sont considérablement altérés : pour une étude plus précise, on doit recourir à la méthode des coupes.

La meilleure technique pour la coloration des microbes dans les frottis est, sans conteste, la méthode de Gram, suivie de décoloration prolongée à l'alcool-acétone, avec légère recoloration du fond à la fuchsine diluée. Les colorations simples donnent des résultats très inconstants ; les microbes, noyés dans une

gangue albumineuse, sont difficiles à distinguer : pour réussir, il faut employer des teintures très diluées, en coloration progressive, et en contrôlant l'opération au microscope.

Avec la méthode de Gram, les cocci apparaissent extrêmement nombreux et groupés en amas. Ces amas contiennent un nombre très variable d'éléments, suivant le degré de la dissociation et de l'étalement, parfois plus de 100. Les microbes

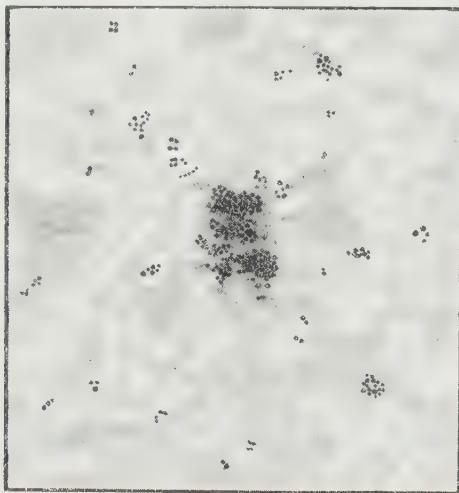


FIG. 1. — Frottis du pus d'un abcès de l'épaule chez une brebis.

sont de tailles très inégales ; à côté de formes géantes² pouvant avoir un diamètre de 2 à 3 μ , on rencontre des formes naines atteignant les limites de la visibilité, et représentant une véritable poussière microbienne (fig. 1 et 2). Les formes moyennes, les plus nombreuses, ont une taille légèrement inférieure au staphylocoque vulgaire des suppurations humaines.

Dans certains amas, les éléments sont confondus, soudés entre eux, et, le demeurent, quelle que soit la durée du temps de décoloration à l'alcool-acétone.

Le Giemsa donne de bons résultats : d'une manière générale, les éléments apparaissent plus petits qu'avec le Gram : la plupart sont colorés en violet-rose ; quelques-uns, les plus petits, en bleu : ces différences de coloration montrent que les microbes

du pus sont à des états physiologiques différents; un grand nombre doivent être morts, comme semble aussi l'indiquer la nécessité d'ensemencer une grande quantité de pus, malgré l'extrême abondance de germes à l'examen direct.

Il est assez rare d'observer sur les frottis la présence des

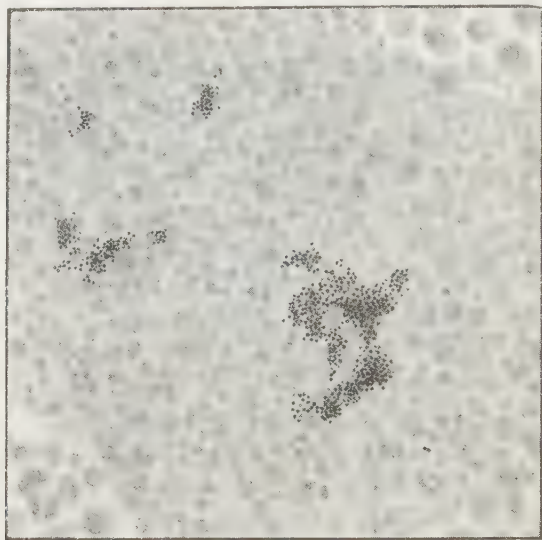


FIG. 2. — Abscess du scrotum chez un agneau.

grains caractéristiques de la botryomycose; cependant il est presque toujours possible de constater qu'entre les différents microbes d'un même amas le fond est légèrement teinté en rose, comme si les éléments étaient réunis en zooglye par une matière capsulaire.

Les grains botryomycosiques peuvent être vus à l'état frais: en écrasant, avec précaution, entre lame et lamelle, un fragment de pus traité par l'acide acétique, on reconnaît des masses arrondies, translucides, contenant des amas de granulations plus réfringentes, qui correspondent aux microbes, mais c'est sur les coupes des abcès que les grains apparaissent avec toute leur netteté. On observe tantôt des grains typiques, constitués par des amas microbiens, renfermés dans une

gangue faiblement colorée et nettement distincte des parties voisines (fig. 3), tantôt de simples amas de cocci fusionnés entre eux : enfin, dans presque tous les cas, on peut constater la présence de cocci simplement réunis en amas. Les grains les plus typiques s'observent dans les lésions les plus anciennes,

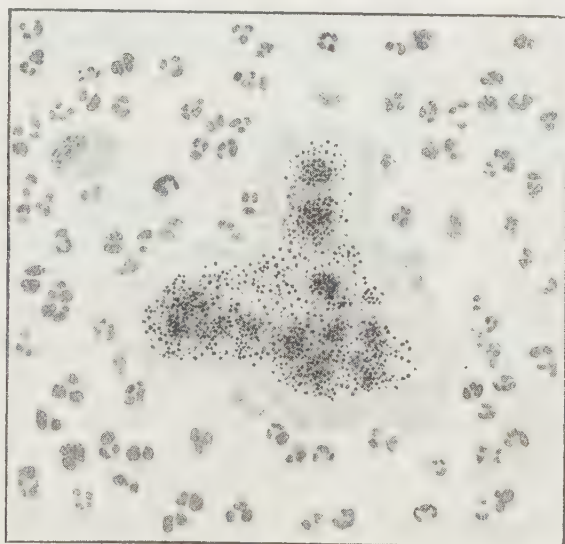


FIG. 3. — Abscès de l'épaule chez un agneau.

et il apparaît comme très probable qu'ils représentent un stade évolutif avancé, correspondant à la guérison par enkystement des germes.

La paroi de l'abcès est constituée par une couche très épaisse de tissu fibreux, même sur les abcès jeunes : une fibrose extrêmement marquée caractérise les lésions de la botryomycose au même titre que la présence des grains. Dans les lésions jeunes, il existe une membrane pyogène qui ne tarde pas à disparaître, et on arrive progressivement à avoir des lésions dans lesquelles la paroi n'est plus représentée que par une couche de tissu fibreux en contact direct avec le pus.

III. — CULTURE DE L'AGENT PATHOGENE.

La culture du staphylocoque de la botryomycose sur les milieux ordinaires est difficile et aléatoire : elle est plus aisée sur les milieux albumineux. Dans tous les cas, aussi bien avec le pus qu'avec les cultures, lesensemencements doivent être très abondants : on doit travailler à la pipette, et non au fil de platine. Je vais d'abord exposer les résultats obtenus avec l'ensemencement du pus.

Dans le bouillon additionné de 10 p. 100 d'ascite ou de sérum, le microbe se développe sans troubler le liquide, ni donner de voile ; il cultive au fond du tube, en produisant lentement un dépôt, qui ne devient guère appréciable qu'au bout de quarante-huit à soixante-douze heures. Vient-on à agiter la culture, le dépôt s'émulsionne ; le plus souvent, le milieu devient trouble et homogène ; cependant, dans quelques cas, avec une agitation modérée, la dissociation se fait en grumeaux comme pour une culture de streptocoques. Si on laisse les tubes au repos, les microbes sédimentent, et le liquide s'éclaircit.

Les bouillons à l'œuf, au sang, donnent les mêmes résultats.

Le développement est plus rapide, plus abondant dans les milieux glucosés, mais la vitalité est moindre.

Dans le bouillon ordinaire, les résultats sont très aléatoires, et on échoue dans un grand nombre de cas. Il est toujours nécessaire d'ensemencer une grande quantité du pus ; les repiquages doivent être également très abondants : l'aspect des cultures est le même. Comme il était facile de le prévoir d'après les caractères de la culture, qui se fait au fond du tube, il s'agit d'un anaérobie facultatif qui pousse aussi bien dans le vide.

Sur gélose additionnée d'ascite ou de sérum, en procédant toujours à desensemencements copieux, on obtient après deux ou trois jours de fines colonies de coloration blanc grisâtre, les unes plates, les autres arrondies, de taille inégale, atteignant un millimètre et quelquefois plus, jamais pigmentées.

Les repiquages à partir d'une colonie isolée sont très hasardeux : pour réussir, il faut ensemenecer largement en prenant plusieurs colonies.

Sur gélose ordinaire, la culture est beaucoup plus difficile, voire impossible dans certains cas. Il est indispensable d'ensemencer très largement avec une pipette, et d'étaler ensuite avec une ôse plate. Le développement, extrêmement lent, ne devient guère apparent qu'au bout d'une semaine. Les colonies cultivent dans deux régions du tube, bien différentes par leurs propriétés physiques : d'une part, au fond, au contact de l'eau de condensation ; d'autre part, à l'extrémité supérieure, même lorsque la gélose commence déjà à se dessécher : la partie moyenne reste stérile, ou ne présente que quelques très rares colonies. Dans tous les cas, les colonies se développent en satellites autour des débris purulents ; elles sont d'aspect absolument variable, plates ou arrondies, et de taille très inégale : on a l'impression de se trouver en face d'une culture impure. Si on essaie de repiquer les colonies isolées, même en utilisant les milieux les plus variés, on échoue le plus souvent. Pour obtenir des cultures filles, il est nécessaire de racler une grande quantité de semence, et l'on parvient ainsi à réaliser des passages, qui deviennent, au bout de quelque temps, plus faciles : en fin de compte, les cultures deviennent aussi aisées qu'avec le staphylocoque ordinaire. Parmi les différentes géloses utilisées, c'est la gélose au bouillon de foie qui donne les meilleurs résultats.

Le sérum coagulé a été essayé dans tous les cas : sur plus de 100 origines, je n'ai pas obtenu plus de 3 à 4 colonies. Comme le Preisz-Nocard y pousse aussi facilement que le bacille diphtérique, ce milieu représente, dans l'étude de la suppuration caséuse, un milieu d'épreuve de premier ordre, et qui doit être systématiquement employé.

Il en est de même du lait. Le Preisz-Nocard s'y développe sans le modifier : le staphylocoque de la suppuration caséuse le coagule en cinq ou six jours, et y produit de l'acidité : le caillot est peu ou pas rétractile : avec quelques échantillons, la coagulation est beaucoup plus lente à se produire, et demande jusqu'à plusieurs semaines. Cette variabilité dans la rapidité de la coagulation n'est pas l'apanage du staphylocoque du mouton : on l'observe avec d'autres staphylocoques, humains ou animaux.

En gélatine additionnée de 10 p. 100 de sérum, à l'étuve, le microbe se développe comme dans le bouillon : si au bout de

huit à dix jours on retire les tubes, on constate qu'ils ne font plus prise.

Le microbe ne pousse pas sur pomme de terre ni sur milieu Pétrof.

Le staphylocoque des abcès attaque un grand nombre de glucides en produisant de l'acidité. Les essais ont été faits en bouillon désucré, additionné de 10 p. 100 de sérum, de 1 p. 100 de sucre, et d'une quantité suffisante de rouge de phénol pour obtenir une teinte légèrement rouge; tous les milieux ont été préparés à froid et stérilisés par filtration.

Un certain nombre de staphylocoques, humains ou animaux, ont été étudiés comparativement: mais il a été impossible de les séparer par leurs propriétés saccharolytiques de celui du mouton: la seule différence, c'est que l'attaque des sucres est beaucoup plus tardive avec ce dernier, mais cela tient à la lenteur de son développement: il en est exactement de même pour la coagulation du lait ou la liquéfaction de la gélatine.

Le glucose, le lévulose, le galactose, le mannose sont régulièrement attaqués: il en est de même du saccharose, du lactose, du maltose. La dextrine, l'amidon, l'inuline donnent lieu à une production plus ou moins rapide d'acide: le xylose et l'arabinose également. Raffinose, tréhalose, rhamnose, mélibiose sont attaqués tardivement, et d'une manière inconstante: le mélézitose donne de l'acidité avec toutes les souches. La glycérine fermente avec tous les échantillons: il en est de même pour la mannite, à quelques exceptions près. La production d'acide est exceptionnelle avec l'érythrite, la dulcité, la sorbite, l'adonite; l'inosite n'est jamais attaquée.

Le staphylocoque de la suppuration caséreuse cultivé en bouillon sérum ne sécrète pas d'hémolysine pour les globules du mouton ou du lapin.

Le microbe ne se développe qu'à la température de l'étuve: à 30°, son développement devient extrêmement lent, pour s'arrêter au-dessous de 20°.

La vitalité à la température de l'étuve est assez restreinte, et, au bout de dix à quinze jours, un grand nombre de repiquages échouent. A la glacière, en bouillon sérum non sucré, il suffit de faire des passages tous les quatre ou cinq mois. Avec le pus conservé en pipettes scellées, à la température du laboratoire,

il est encore possible d'obtenir des cultures au bout de six à huit semaines : avec du pus de quatre mois, les ensemencements sont demeurés stériles, mais l'inoculation a été positive.

La résistance des cultures à la chaleur est du même ordre de grandeur que pour le staphylocoque : elles résistent une heure à une température de 56°; elles sont tuées en cinq minutes à 64°, en vingt minutes à 60°.

Les préparations de cultures sur milieux solides montrent un *Coccus* retenant énergiquement le Gram, et ne se différenciant pas du staphylocoque ordinaire. Dans le dépôt des cultures en bouillon, le microbe se présente en amas, ayant tout à fait l'aspect des cultures du staphylocoque : à l'état frais entre lame et lamelle, les cocci apparaissent nettement séparés : à l'ultra-microscope, la délimitation, entre les différents éléments constituant un amas, devient beaucoup moins nette. Par la méthode à l'encre de Chine, suivant la technique de Borin, la délimitation des grains ne peut plus se faire. Il semble donc que, dans les milieux albumineux comme dans le pus, les microbes, constituant les amas, soient assemblés par une gangue, une substance capsulaire, particulièrement difficile à mettre en évidence.

Par sa morphologie et par son aptitude à donner des formations botryomycosiques dans le pus, le microbe que je viens de décrire se comporte comme un staphylocoque; il en est de même par son action sur le lait, la gélatine, les sucres. Entre les deux germes, une seule différence : la difficulté d'obtention des premières cultures et de l'adaptation aux milieux artificiels, mais ce caractère a une valeur très relative, et peut s'observer sur nombre de microbes au sortir de l'organisme ; il ne saurait constituer un caractère différentiel : je ne puis donc que confirmer mes conclusions antérieures : il ne s'agit pas d'un germe nouveau, d'un *Coccus* spécial, *Coccus* Aynaud (H. Carré), mais d'un staphylocoque qui, à la sortie de l'organisme, n'est pas pigmenté ; ce caractère négatif, insuffisant pour en faire un germe nouveau, n'est d'ailleurs que transitoire, et nous allons voir comment il est possible, par des cultures successives, d'amener le microbe à produire du pigment, en un mot, de lui conférer tous les caractères du staphylocoque doré. C'est un fait bien connu que la pigmentation du staphylocoque, propriété

éminemment variable, se manifeste surtout sur les milieux solides, sérum coagulé, pomme de terre, et, à basse température : or, le staphylocoque de la suppuration caséuse, au sortir de l'organisme, ne cultive pas sur ces milieux, et nécessite la température de l'étuve : il n'est donc pas extraordinaire que dans les conditions habituelles de culture de ce germe la production de pigment n'ait pas lieu ; mais il est possible de la réaliser de différentes façons.

La description que je viens de donner du staphylocoque de la suppuration caséuse correspond au type moyen le plus répandu. A côté de souches qu'il est très difficile, sinon impossible, de cultiver sur les milieux ordinaires, on en rencontre d'autres pour lesquelles l'adaptation à ces milieux est beaucoup plus facile, et la pigmentation plus aisée à obtenir : telle est la souche 362 ; le passage de bouillon sérum sur bouillon ordinaire donne une culture trouble avec dépôt au fond, mais rigoureusement pure, comme le démontrent les séparations sur gélose ; on obtient ainsi deux types de colonies, de grosses colonies pigmentées, et de fines colonies sans pigment ; ces dernières sont cependant constituées par du staphylocoque, et se sont pigmentées dans les passages ultérieurs.

Résultats du même ordre avec la souche 380 *a*. La culture initiale sur gélose ordinaire est très grêle, à peine apparente ; elle est étalée au fil de platine de manière à couvrir toute la surface et reportée huit jours plus tard sur gélose. La nouvelle culture pigmentée est repiquable sur pomme de terre, sérum coagulé, et donne sur ces milieux une belle pigmentation ; en bouillon ordinaire, culture trouble avec dépôt abondant ; en eau peptonée, culture trouble, sans production d'indol. Il est intéressant de noter que le sujet porteur de cet abcès dans la cuisse en avait un deuxième périmammaire, dont le germe correspondait au type difficile à cultiver.

Ces deux échantillons représentent un type extrême, se rapprochant le plus du staphylocoque doré classique. En général, l'adaptation aux milieux non albumineux est plus lente, la pigmentation plus longue à se manifester, et il est nécessaire de recourir à un autre procédé pour obtenir le passage sur milieux ordinaires.

La technique qui m'a donné les résultats les plus constants

(80 p. 100 de succès) est la suivante : le culot d'une culture en bouillon sérum est largement ensemencé à la pipette sur gélose inclinée ; la gélose au foie est de beaucoup préférable. Au bout de cinq à six jours, quelques colonies se sont développées, on arrose la surface avec l'eau de condensation, et on recommence deux ou trois fois, à quelques jours d'intervalle, la même opération ; on réalise ensuite avec la même technique plusieurs passages ; ils deviennent de plus en plus faciles, et les cultures de plus en plus abondantes ; à partir du sixième au huitième jour, la pigmentation commence à se produire.

Les cultures pigmentées ainsi obtenues, reportées sur les différents milieux, ont tous les caractères du staphylocoque doré classique : en bouillon, culture trouble avec dépôt, et parfois collerette, ou ébauche de voile ; elles poussent sur pomme de terre et sérum coagulé en donnant du pigment. Dans les cultures en eau peptonée, pas de production d'indol ; réduction des nitrates en nitrites ; pas de production d'hydrogène sulfuré en gélose au plomb ; tous ces caractères, qu'il est impossible d'étudier sur les cultures en milieux albumineux, complètent la détermination du staphylocoque de la suppuration caséuse, et justifient son assimilation au staphylocoque pyogène.

Cette étude de la suppuration caséuse du mouton serait incomplète si je ne rapprochais ce germe d'autres staphylocoques rencontrés dans la même espèce. Je dois tout d'abord faire observer que le staphylocoque, germe ubiquitaire, n'est pas cependant l'agent des suppurations banales du mouton à la suite de plaies (traumatiques, ombilicales, opératoires) ; le germe que l'on rencontre habituellement dans ces circonstances est le bacille pyogène de Poels (1), le plus souvent pur dans les abcès consécutifs au mal de nombril, associé parfois dans les autres à une flore Gram-négative (*Pasteurella*, *Proteus*, *Pyocyanique*), surtout dans les lésions ouvertes ; la présence de cocci Gram-positifs est assez rare, et ils ne représentent jamais l'espèce prédominante. Le Preisz-Nocard est tout à fait exceptionnel.

Dans la mammite gangréneuse de la brebis, j'ai rencontré

(1) BILAL (Saïd), Contribution à l'étude du bacille pyogène de Poels. *Ces Annales*, 40, 1926, p. 846.

d'une manière constante le staphylocoque de Nocard; avant l'ouverture des lésions, ce microbe existe à l'état de pureté, à l'exclusion de tout autre germe, aérobie ou anaérobie. Assez souvent, les cultures ne sont pas pigmentées, mais elles le deviennent à la suite de passages sur gélose. Un cas particulièrement instructif est celui de la brebis 547 sur laquelle j'ai pu, au laboratoire, faire dans les meilleures conditions tous les prélèvements nécessaires. L'hémoculture a donné exclusivement des staphylocoques non pigmentés, coagulant le lait, liquéfiant la gélatine. La culture de la sérosité mammaire a fourni trois souches poussant en fines colonies, coagulant le lait, mais qui n'ont pu repousser sur milieux usuels. Elle a fourni également deux souches à grosses colonies, pigmentées, liquéfiant la gélatine, coagulant le lait. On voit combien sont variables, au départ, et sur le même sujet, les caractères des staphylocoques, qui peuvent être pigmentés ou non, donner de grosses ou de fines colonies, cultiver ou non sur les milieux ordinaires. Un autre fait à retenir, c'est que la brebis, malgré une septicémie à staphylocoques, a parfaitement guéri, à la suite de larges débridements de la mamelle au thermocautère. Il faut donc en conclure que le passage du staphylocoque dans le sang peut se produire chez le mouton sans entraîner la mort. Nous verrons plus loin l'innocuité des injections intraveineuses : ces constatations sont à retenir pour expliquer la pathogénie des abcès.

Le passage du staphylocoque dans le sang du mouton est d'ailleurs loin d'être un fait exceptionnel : j'ai pu le constater dans d'autres cas sur des animaux sacrifiés *in extremis*, et, dans ces cas, j'ai obtenu chez le même sujet de grosses colonies, donnant d'emblée du pigment et de fines colonies plus lentes à se pigmenter.

De l'ensemble de ces faits, il résulte qu'il est exceptionnel chez le mouton d'observer au départ le staphylocoque avec les caractères classiques du staphylocoque doré du furoncle ou de l'ostéomyélite, mais, entre ce dernier et le staphylocoque de la suppuration caséuse, il est possible, pour cette espèce, et dans des lésions différentes, d'observer toutes les transitions entre les deux types. D'autre part, par la culture sur les milieux artificiels, on arrive, dans la plupart des cas, à amener

le deuxième type à récupérer les caractères du premier. Il n'y a donc pas lieu, comme le propose H. Carré, de faire du staphylocoque, que j'ai fait connaître dans la suppuration caséuse, un germe nouveau.

La botryomycose ovine, comme la botryomycose équine, est une suppuration staphylococcique.

IV. — REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DES ABCÈS.

L'inoculation aux animaux de laboratoire échoue régulièrement aussi bien avec le pus des abcès qu'avec les cultures. Ces dernières ont été utilisées après quarante-huit heures d'étuve, en bouillon sérum, à la dose de 1 à 2 cent. cubes, dose qui était pyogène pour le mouton et la chèvre. Plus de 100 cobayes ont été inoculés avec différentes souches dans le péritoine ou dans les muscles, sans obtenir le moindre résultat. Il n'a jamais été possible, en particulier, de produire la moindre orchite; il ne saurait donc être question d'infection à Preisz-Nocard, ni même d'association du Preisz-Nocard et du staphylocoque. Résultats également négatifs sur le lapin et la souris; même insuccès en injection intra-musculaire sur trois veaux et deux porcs, alors que les chèvres témoins présentaient de gros abcès. Les seules espèces sensibles sont le mouton et la chèvre; des expériences préliminaires m'ont démontré que leur réceptivité était sensiblement la même; aussi pour des raisons économiques ai-je choisi comme animal d'expérience cette dernière; un autre avantage de la chèvre, c'est que dans la Beauce et le Perche, où elle n'existe qu'à l'état isolé, elle ne présente jamais d'abcès spontanés. Plus de 200 caprins ont été utilisés; ce sont les résultats obtenus sur ces sujets que je vais brièvement exposer.

Le procédé de choix pour obtenir des abcès est l'injection intra-musculaire; il est particulièrement commode de la pratiquer dans les muscles des régions interne ou externe de la cuisse, qui constituent des masses isolées, que l'on peut palper à pleine main; il est facile de suivre ainsi la formation et l'évolution des abcès.

La dose pyogène varie suivant les souches — il s'agit de souches récemment isolées — de 0,1 à 0,5, ou 1 cent. cube de

culture en bouillon sérum de quarante-huit heures inoculé après émulsion du dépôt. Quelques échantillons, une infime minorité, se sont montrés inactifs à ces doses; il s'agit sans doute de cultures provenant d'abcès très anciens, évoluant vers la stérilisation spontanée.

Le développement des abcès inoculés est extrêmement lent

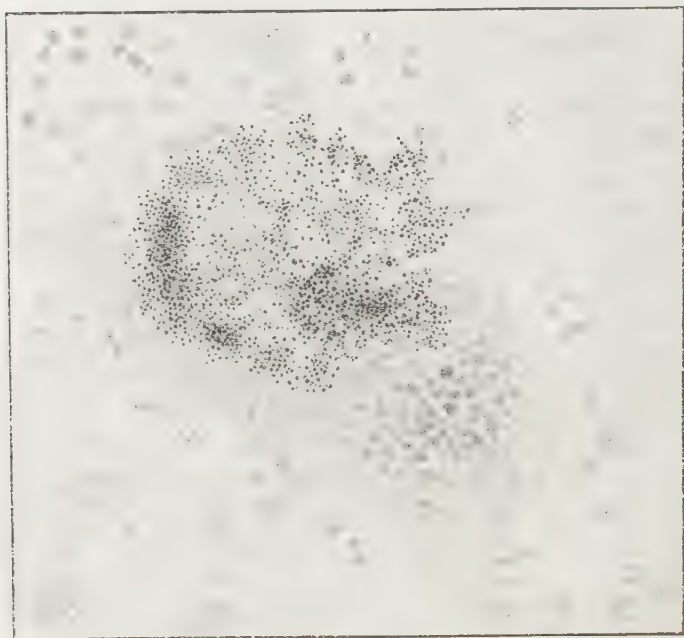


FIG. 4. — Coupe de testicule de bouc après injection d'un dixième de culture sur gélose ordinaire (culture très grêle).

et tout à fait comparable à celui de l'infection naturelle; on n'observe jamais la moindre atteinte de l'état général, les troubles fonctionnels] sont absolument exceptionnels, et ce n'est que dans de très rares cas que l'on peut noter une légère boiterie de très courte durée. Au bout de dix à quinze jours une légère tuméfaction devient perceptible au siège de l'inoculation, elle va progressivement en augmentant, et, après plusieurs semaines, on se trouve en présence d'un abcès froid, pouvant contenir jusqu'à 200 à 300 grammes de pus caséux

ayant absolument le même aspect, la même consistance, la même composition microbienne que celui de la maladie naturelle. On en isole le même germe, doué des mêmes propriétés pathogènes. La lésion, en règle générale, demeure strictement limitée au point d'inoculation; deux fois seulement, j'ai vu se produire un abcès dans le voisinage. Jamais même avec de fortes doses on ne produit la mort de l'animal, la maladie inoculée, aussi bien que la maladie naturelle, se résume en un ou plusieurs abcès: c'est la maladie des abcès, comme l'appellent si justement les éleveurs.

L'injection intra-testiculaire donne les mêmes résultats que la voie intra-musculaire; elle est cependant plus sensible puisqu'avec 1/100^e de cent. cube on obtient de volumineux abcès avec des souches pyogènes pour le muscle à 1/10^e de cent. cube. Par ce procédé, il est tout à fait facile de suivre la progression des abcès; de plus les lésions sont extrêmement riches en grains botryomycosiques, et aussi en masses actinomycotiques (fig. 4). On sait que Magrou (1) a obtenu de pareilles lésions avec le staphylocoque dans le testicule du lapin et du cobaye, en y insérant un crin de cheval imprégné de culture; chez le béliet et le bouc, l'inoculation d'une faible dose de culture, sans artifice spécial, suffit à reproduire les lésions les plus typiques.

Sur un chevreau, j'ai inoculé, après trépanation, dans la moelle osseuse du tibia 1/10^e de cent. cube de culture: l'animal sacrifié six semaines plus tard présentait une exostose très nette au point d'inoculation; dans le canal médullaire, il y avait un foyer purulent, extrêmement riche en formations botryomycosiques.

Une injection intra-trachéale est demeurée sans effet; il en a été de même de deux injections intra-pleurales: une injection intra-péritonéale a produit un abcès entre deux anses intestinales, et un autre entre les muscles de la paroi abdominale.

L'injection sous-cutanée, j'entends dans le tissu cellulaire lâche, et non dans les muscles superficiels, fournit des résultats extrêmement variables, mais, dans tous les cas, les lésions sont infiniment moindres que par la voie musculaire. Dans une

(1) Ces *Annales*, 1919, p. 344.

minorité d'expériences, on obtient de petits abcès, une olive à une noix; le plus souvent, on échoue; l'injection diffuse sans doute dans les espaces lymphatiques, la culture est diluée, et la densité microbienne nécessaire à la production d'un abcès n'est pas réalisée; peut-être une autre cause est à envisager, que l'injection intra-veineuse va nous faire entrevoir.

Avec cette dernière, on obtient des résultats encore plus inconstants qu'avec l'inoculation sous-cutanée: sur sept chèvres inoculées par cette voie, avec des doses considérables, jusqu'à 10, 30 cent. cubes, deux fois seulement, sur les animaux sacrifiés au bout de six semaines à deux mois, j'ai constaté des abcès: dans le premier cas, il existait deux abcès de la taille d'un pois dans les poumons, deux autres comme un œuf, pré-vertébraux, et, un troisième dans les muscles: dans le deuxième, sur un sujet ayant reçu une injection de 30 cent. cubes, j'ai trouvé un abcès gros comme une noix à la face interne des côtes, et un autre plus petit dans le poumon. Dans toutes ces expériences, j'ai pris les plus grands soins pour que l'injection fût rigoureusement intra-veineuse; la veine était ponctionnée au trocart, et c'est à travers ce dernier que l'injection était poussée avec une seringue armée d'un trocart plus petit, pour ne pas blesser l'endoveine. Malgré ces précautions, dans presque tous les cas, il s'est produit un ou plusieurs abcès au niveau de la piqure. Ces faits mettent bien en évidence le rôle et l'importance de la lésion locale dans la production des abcès: alors que l'injection dans la veine de grosses quantités de culture demeure le plus souvent sans effet, l'infime quantité de sang qui a pu fuser à travers la plaie veineuse permet la fixation des microbes en circulation et la production d'abcès le long du trajet d'inoculation: il ne suffit donc pas que le microbe soit présent dans le sang, il faut une lésion locale, un point d'appel, de fixation pour permettre son développement. Sans doute en est-il de même pour l'injection sous-cutanée, qui diffuse à grande distance en se diluant, alors que l'injection intra-musculaire ou intra-testiculaire reste localisée, et détermine une lésion qui permet la fixation et le développement du microbe.

J'ai essayé sur deux chevreaux de reproduire la maladie par ingestion: ces animaux ont absorbé en un mois 80 cent.

cubes de culture, mélangée à de l'avoine non aplatie, dans le but de favoriser les inoculations de la muqueuse digestive; sacrifiés quatre mois plus tard, ils ne présentaient pas trace d'abcès.

Tels sont les résultats que l'on obtient avec des doses faibles ou moyennes de culture; ils mettent en évidence le rôle essentiellement pyogène du microbe étudié, particulièrement net pour les injections intra-musculaires et intra-testiculaires; l'injection dans le tissu cellulaire, dans les séreuses, donne des résultats inconstants ou négatifs, pour les raisons que je viens d'indiquer. Jamais on ne produit la mort des animaux, même par la voie veineuse, et à doses élevées; tout ce que l'on réalise, c'est un abcès localisé, sans retentissement sur l'état général, comme dans la maladie naturelle. Il est d'ailleurs impossible de constater la moindre toxine dans le filtrat des cultures: seuls les microbes vivants, inoculés à très hautes doses, 4 à 5 centigrammes, sont toxiques: les animaux succombent dans les vingt-quatre heures avec un œdème hémorragique au point d'inoculation; il n'y a pas de généralisation, le sang du cœur est stérile.

Les cultures, obtenues avec le pus des abcès expérimentaux, ont les mêmes caractères que celles obtenues avec le pus des abcès de la maladie naturelle: même difficulté en dehors des milieux albumineux, même aspect. Par accoutumance sur les milieux ordinaires — et peut-être avec un peu plus de facilité que pour les origines — on obtient des souches pigmentées.

Il n'est pas rare de voir chez un même sujet des abcès se succéder à plusieurs semaines, ou à plusieurs mois d'intervalle: il était donc à prévoir que les inoculations successives sur le même animal ne vaccineraient pas, et produiraient de nouveaux abcès. C'est ce que l'expérience a permis de vérifier: il ne se développe d'ailleurs pas davantage d'hypersensibilité. Les cultures non virulentes sont également dénuées de toutes propriétés vaccinales.

Les lésions obtenues par inoculation de cultures sont absolument identiques aux abcès de la maladie naturelle; le pus a la même consistance, la même composition; il contient dans les abcès un peu anciens des cristaux de leucine, de tyrosine, de cholestérine. Les staphylocoques y sont toujours en très grande

abondance, tantôt simplement groupés en amas, tantôt fusionnés en un seul bloc, retenant énergiquement le Gram, et dans lequel les germes ont perdu toute individualité; enfin, et c'est très probablement le stade ultime de l'évolution, on observe en abondance des grains absolument typiques entre eux. Dans le testicule, on obtient, avec encore plus de facilité, la production de grains, et dans certains cas de massues absolument analogues à celles de l'actinomycose (fig. 4).

Les abcès jeunes sont limités par une membrane pyogène leucocytaire, mais, dès le début, la réaction fibro-conjonctive est très marquée, et se traduit par le développement d'une membrane fibreuse épaisse, très peu vascularisée; l'abcès est toujours limité, enkysté, sans tendance à fuser dans les régions voisines. Réaction fibreuse et réaction purulente varient en raison inverse l'une de l'autre, suivant la virulence des souches étudiées; avec des germes peu virulents, ou ayant séjourné longtemps dans les milieux de culture, c'est la réaction fibreuse qui domine: on obtient de véritables fibromes, ayant le volume d'une olive ou d'une noix, contenant au centre une minuscule goutte purulente avec les grains caractéristiques.

L'ensemble des expériences que je viens de rapporter démontre que l'inoculation du staphylocoque isolé des abcès reproduit exactement le tableau de la maladie naturelle: on obtient un abcès plus ou moins volumineux sans réaction de l'organisme. Qu'il s'agisse de la maladie naturelle ou de la maladie inoculée, on observe un seul et même processus de réaction; dans les deux cas, l'aspect du pus, la structure des parois de l'abcès sont identiques; enfin l'inoculation des cultures, sans artifice spécial, réalise avec la plus grande facilité la production des grains caractéristiques de la botryomycose.

V. — LA BOTRYOMYCOSE CHEZ LES DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES.

Ce serait dépasser le cadre de ce travail que de faire l'histoire complète de la botryomycose: je crois cependant intéressant d'en donner un court aperçu, pour situer, par rapport aux affections similaires observées chez d'autres espèces, la maladie que je viens de décrire chez le mouton.

Le terme de botryomycose a été créé par Bollinger en 1887,

pour désigner des formations qu'il avait observées en 1870 dans le champignon de castration du cheval. Le champignon de castration est caractérisé par une tumeur fibreuse pouvant atteindre des dimensions énormes, et évoluant d'une manière essentiellement torpide; l'intérieur de la tumeur est occupé par des loges remplies d'un pus épais, contenant des grains réunis en grappes, d'où le nom de la maladie; ces grappes peuvent chez le cheval atteindre un diamètre de 4 à 500 μ . Ces formations, prises d'abord pour un champignon, sont en réalité constituées par des coccis enrobés dans une gangue, qui, à la périphérie du grain, se condense pour former une membrane. De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude du microbe des grains (Kitt, Mari, de Jong, Mac Fadyean, J. Magrou, J. Dumas, M. Nicolle et Césari); tous les auteurs sont d'accord aujourd'hui pour admettre qu'il s'agit d'une suppuration à staphylocoque, et plus spécialement à staphylocoque doré. Je dois cependant faire observer que Mac Fadyean a trouvé des staphylocoques non pigmentés; moi-même, dans un cas, j'ai isolé des colonies pigmentées, et d'autres incolores. Ces dernières, qui ont conservé leurs caractères originels pendant plus de deux ans, étaient pathogènes pour le lapin et la souris, aussi bien que les colonies pigmentées.

En résumé, au point de vue clinique, les lésions botryomycosiques sont essentiellement caractérisées par une évolution lente et torpide; au point de vue de l'anatomie pathologique, elles se distinguent des autres suppurations chroniques par la réaction fibreuse extraordinairement marquée, et par la présence de grains. Enfin, dans tous les cas, on peut mettre en évidence le staphylocoque à l'exclusion de tout autre germe.

Chez un certain nombre de sujets, le champignon de castration ne demeure pas localisé au cordon; des foyers secondaires peuvent se rencontrer dans le péritoine, le foie, la rate, et surtout dans les poumons; ces foyers ont les mêmes caractères que le foyer primitif: la réaction fibreuse, toujours très prononcée, leur a fait donner, dans certains cas, le nom de myco-fibromes, de fibromes infectieux.

Chez un certain nombre de sujets, ces abcès viscéraux ou sous-cutanés évoluent pour leur propre compte, en dehors de tout

champignon de castration, et l'étiologie de la maladie est alors complètement inconnue.

Chez le bœuf, la botryomycose a été signalée d'une manière tout à fait exceptionnelle, principalement sous la forme d'abcès froids siégeant dans les masses musculaires et sous la peau. Il en est de même chez le porc. L'affection, jusqu'à ma note de 1922, n'avait jamais été signalée chez le mouton.

Chez l'homme, un seul cas a été publié par P. Masson (1) en 1918. Il faut en effet faire complètement abstraction de la botryomycose de Poncet et Dor, qui concerne des tumeurs pédiculées, non suppurées, et n'ayant absolument rien de commun avec la botryomycose animale. L'observation de Masson a trait à une plaie de guerre de la cuisse, fistulisée, avec séquestre osseux : le staphylocoque s'y montrait sous forme de grains, avec le même aspect que dans la botryomycose animale.

Le cas de Masson ne restera pas sans doute unique, et il est probable que des formations analogues seront un jour observées dans les suppurations chroniques humaines à staphylocoque.

Par ce rapide exposé, il apparaît que le domaine de la botryomycose n'est pas limitée à l'espèce équine, ni au champignon de castration : le porc, le bœuf sont atteints, et j'ai montré sa fréquence chez le mouton. Il n'est pas douteux que les cas deviendront plus fréquents quand les auteurs ne se limiteront plus, pour l'étude du pus, à la méthode brutale des frottis, mais rechercheront les grains soit à l'état frais, soit par la méthode des coupes.

Enfin, dans tous ces cas, quelle que soit l'espèce animale envisagée, le seul microbe causal a été le staphylocoque, qui nous apparaît comme un germe doué de *propriétés botryomycogènes* très étendues; c'est à l'heure actuelle le seul microbe connu doué de ce pouvoir, qui constitue pour lui un caractère important et spécifique, au même titre que le pouvoir tuberculigène pour le bacille de Koch.

Après cet exposé complet du sujet je puis aborder la discus-

(1) P. Masson, Plaie de guerre botryomycosique. *C. R. Soc. Biol.*, 81, 26 juin 1918.

sion de la réclamation de H. Carré (1) en faveur de G. Morel; à en juger par la description du Coccus Morel par H. Carré, elle apparaît parfaitement légitime, mais le lecteur sera probablement aussi étonné que moi de lire la phrase suivante qui termine la description du Coccus Morel par H. Carré, et dans laquelle je me borne à souligner trois mots: « Les *caractères* culturaux que j'assigne au microcoque Morel et mes *résultats* expérimentaux s'écartent *totale*ment de ceux relatés par Morel lui-même ».

Et, en effet, si l'on se rapporte au mémoire original de Morel (2), le seul dont y ait lieu de tenir compte suivant les usages unanimement admis en matière de contestation scientifique, on s'aperçoit que le microcoque décrit par Morel est totalement différent non seulement du staphylocoque de la botryomycose, mais encore du microcoque Morel, *tel que le décrit H. Carré*. Je transcris textuellement la description de Morel « microcoque assez gros, isolé, disposé en amas de 2, 4 ou plusieurs éléments, se colorant facilement et prenant le Gram. Cultivant facilement sur tous les milieux, où il conserve la forme arrondie; la culture sur pomme de terre est jaune ocracée. Dans le bouillon Martin, qu'il ne trouble pas, le microcoque forme un voile jaunâtre et chagriné. Sur gélose, culture crémeuse en petits amas, légèrement rosée ».

Il est évident que G. Morel a eu des cultures impures contenant plusieurs espèces, deux au moins, l'une donnant un pigment jaune, l'autre un pigment rose. H. Carré admet en plus, les cultures ayant un voile, qu'il y a association au Preisz-Nocard. Sans prendre parti sur ce dernier point, un fait incontestable s'impose: G. Morel n'a pas cultivé le staphylocoque de la maladie des abcès.

Une preuve de plus, s'il était nécessaire, serait fournie par les résultats des inoculations des cultures de G. Morel: quelques gouttes chez le cobaye, injectées dans le péritoine, provoquent une vaginalite suppurée, alors que le staphylocoque de la botryomycose est totalement dénué de virulence pour cette

(1) La suppuration et les microbes pyogènes des petits ruminants. *Revue Générale de Médecine vétérinaire*, 36, 1921, p. 241.

(2) G. MOREL, Contribution à l'étude de l'adénite caséuse du mouton. *Journal de Médecine vétérinaire et de zootechnie*, 62, 30 septembre 1911, p. 513.

espèce. Avec 5 cent. cubes de culture en bouillon, G. Morel tue le mouton en trois jours de septicémie, sans abcès; nous avons vu qu'avec le staphylocoque du mouton, même avec des doses infiniment plus élevées, en injection intra-veineuse, il est impossible d'obtenir la mort des animaux.

Un seul fait incontestable se dégage du travail de Morel; dans le pus de quelques cas de suppuration caséuse, *il a vu qu'il n'y avait pas le Preisz-Nocard*, et cette constatation négative est extrêmement intéressante, puisqu'elle permet d'affirmer que, dès 1911, dans le pus des abcès du mouton, d'autres germes que le Preisz-Nocard pouvaient se rencontrer, contrairement aux conceptions unanimement admises, à la suite des nombreux travaux de H. Carré. G. Morel a vu, à l'examen direct, un « microcoque »; c'est cette expression microcoque qu'il emploie seul dans son travail, à l'exclusion de celle de staphylocoque; loin d'assimiler son microbe au staphylocoque, il l'en différencie nettement. Il attribue, en effet, l'origine des abcès à des morsures de chiens, et a recherché son microcoque dans la salive de cet animal: il y trouve, à côté de son microcoque, un bacille Gram-positif, et le *staphylocoque blanc*.

En résumé, G. Morel a eu le mérite, très grand, en 1911, de constater, contrairement aux idées unanimement admises sur le rôle prépondérant, sinon exclusif, du Preisz-Nocard en pathologie ovine (1), rôle qui n'avait jamais été contesté en matière d'abcès, *qu'il y avait des abcès dans lesquels on ne voyait pas le Preisz-Nocard*, mais il n'est pas parvenu à cultiver le microbe causal, ni même à l'identifier, pas plus qu'à reproduire la maladie. Son travail est passé complètement inaperçu; aucune mention n'en est faite, dans les travaux français ou étrangers, jusqu'au traité de Moussu en 1923 (2).

VI. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Il existe une forme spéciale de suppuration du mouton qui, tant par la présence de grains caractéristiques dans le pus et

(1) BIGOTEAU (L.) et BIS-AUGE (R.), Hygiène et maladies du mouton. Paris, 1912, Asselin et Houzeau.

(2) La discussion complète du mémoire de H. Carré est exposé dans mon article du 15 septembre 1927 de la *Revue Générale de Médecine Vétérinaire*: La Botryomycose des Ovins.

les parois des abcès, que par la présence du staphylocoque, représente chez les ovins l'équivalent des lésions botryomycosiques du cheval, du bœuf et du porc.

Le pouvoir botryomycogène apparaît donc comme une propriété caractéristique du staphylocoque.

L'inoculation intra-musculaire, intra-testiculaire, régulièrement, et parfois sous-cutanée, du microbe isolé reproduit des lésions identiques à celles de la maladie naturelle. Cependant, l'injection intra-veineuse, même à très hautes doses, échoue le plus souvent. Je n'ai pas réussi, ainsi que H. Carré, à reproduire la maladie par ingestion.

D'autre part, quoique très répandue, la suppuration caséreuse se cantonne et se propage dans certaines troupes, où elle apparaît comme une affection contagieuse ; cette limitation à certaines troupes semble difficilement explicable, avec un germe aussi ubiquitaire que le staphylocoque.

Ces constatations ne doivent pas cependant faire contester le rôle du staphylocoque, ni invoquer avec H. Carré, au moins dans les cas graves, une association avec le Preisz-Nocard que, pour ma part, je n'ai jamais rencontrée jusqu'ici ; elles montrent seulement que nous ignorons le mode de propagation de la maladie naturelle. Des expériences et des observations en cours me permettent d'espérer que cette lacune pourra être prochainement comblée.

*(Chartres, Laboratoire départemental de bactériologie
d'Eure-et-Loir.)*

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNISATION
VIS-A-VIS DE LA PIROPLASMOSE (BABÉSIELLOSE)
DES BOIDÉS**

*Service de Protozoologie de l'Institut bactériologique-vétérinaire
à Léninegrad
(Chef du Service, professeur W. L. YAKIMOFF).*

**PREMIÈRE PARTIE
ESSAIS D'IMMUNISATION EXPÉRIMENTALE
DES ANIMAUX**

Par le professeur W. L. YAKIMOFF,
M^{me} E. N. MARKOFF-PÉTRASCHEWSKY, médecin-vétérinaire,
W. L. LOUKIANOFF et M^{lle} WOITZEKHOWSKY, étudiants.

Il existe trois moyens de lutter contre la piroplasmose des bovidés (agent étiologique : *Babesiella bovis* Babes, 1888) au Nord-Ouest de la Russie : 1° traitement des malades, 2° immunisation des animaux et 3° lutte contre les tiques.

Le premier moyen est le plus faible et peut servir seulement dans les cas où la piroplasmose existe à l'état sporadique ; mais si la maladie se propage en masse, les forces, le temps et les moyens ne suffisent plus pour mener la lutte jusqu'à plein succès.

La lutte contre les tiques — transmetteurs de la maladie (*Ixodes ricinus* L.) — se partage à son tour en deux lignes :

1° La lutte contre les tiques proprement dites : vu la biologie de l'*Ixodes ricinus* et les circonstances spéciales pour nos contrées, il est douteux que cette mesure amène à de bons résultats ; aussi envisageons-nous sceptiquement les tentatives qu'on fait actuellement ;

2° Pour résoudre définitivement le problème de la lutte contre la piroplasmose, le meilleur moyen serait de supprimer les conditions qui favorisent le développement des tiques, c'est-à-dire des pâturages marécageux ; par conséquent, la seule mesure efficace est l'amélioration ; malheureusement,

nous ne pouvons que rêver à quelque chose de semblable.

Il ne nous reste donc qu'un seul moyen — c'est l'immunisation. Le problème d'immunisation dans le Nord-Ouest de la Russie n'est pas nouveau. Depuis 1912 le Zemstwo du gouvernement de Novgorod s'en est occupé dans la personne du médecin-vétérinaire I. V. Saïkowitsch; actuellement, le médecin-vétérinaire N. W. Elmanoff y travaille. Nous parlerons plus tard des résultats de ces travaux.

Cette même question s'est posée à nous pendant notre campagne antipiroplasmosique au gouvernement de Pétrograde (= Lénigrade); aussi avons-nous décidé d'entreprendre une série d'expériences d'immunisation.

A. — Bibliographie.

I. — VACCINATION PAR LE SANG D'ANIMAUX GUÉRIS.

Tidswell et Pound ont introduit la méthode d'injection sous-cutanée de sang retiré de veaux soixante jours environ après leur guérison. Plus tard cette méthode a été appliquée par toute une série d'auteurs : Th. Smith, Kilborne et Schweiger en Amérique, Francis au Texas, Theiler en Afrique, V. Hellens en Finlande. En Allemagne Kossel, Schütz, Weber, Miessner, Schmidt, Schültze et Pröschold ont eu pour matériel le sang tiré de la jugulaire d'un animal et ensuite défibriné; cet animal avait passé deux ou trois mois auparavant par une infection, soit naturelle (Kossel), soit expérimentale (Schütz).

Voyons ce que dit la statistique sur les résultats de cette immunisation. Les résultats obtenus en Allemagne paraissent satisfaisants; c'est ainsi que Miessner a vacciné, en 1907-1909, 2.980 jeunes animaux et 1.598 adultes avec résultats non satisfaisants dans 1,32-2,5 p. 100 des cas; pendant la dernière année (1909), parmi les 429 non immunisés, la perte a été de 10 p. 100. Dans dix fermes, où a opéré Schmidt, il y a eu parmi le bétail vacciné 4,14 p. 100 de malades légers et 0,46 p. 100 de malades graves; parmi le bétail non immunisé, 19,6 p. 100 tombèrent malades légèrement et 7,48 p. 100 malades grave-

ment. De 1909 à 1912, en Poméranie, Pröschold a vacciné 12.686 animaux, dont 6,62, 8,15, 5,10 et 3,65 p. 100 ont été atteints au cours de ces années.

En Amérique jusqu'à la fin de l'année 1901, sur 1.251 vaccinés, 9,2 p. 100 succombèrent. En Australie parmi 35.000 animaux il y a eu une perte de 3-4 p. 100; plus tard, parmi 17.960 vaccinés, il succomba en été 3-6 p. 100. D'après les données de Francis, cette méthode eut pour conséquence une mortalité de 3 p. 100 au cours de la fièvre vaccinale et de 5 p. 100 après la vaccination, comme suite d'infection par des tiques.

Pour ce qui concerne cette méthode, Nocard a dit qu'elle était empirique et précaire, qu'elle pouvait entraîner à des erreurs sérieuses et qu'elle avait peu de chance d'être généralement admise. Il fonde cette opinion sur la supposition, tout à fait correcte, que le degré d'immunité conférée varie selon l'intensité de la réaction; mais comme le caractère contagieux du sang est extrêmement variable il est impossible de prévoir la réaction et il y a toujours danger de susciter des phénomènes graves et mortels, ou bien par contre de produire une infection trop légère et insuffisante pour préserver l'animal de maladies ultérieures.

En Russie, cette méthode d'infection a été appliquée par Elmanoff à Waldai (gouvernement de Novgorod). Il tirait le matériel nécessaire d'une vache expérimentalement infectée à partir d'un veau. La dose employée (sang défibriné) était de 5 cent. cubes. Il vaccina en tout 54 animaux (41 adultes et 13 génisses). La seconde vaccination fut faite une semaine plus tard. Ensuite 4 animaux des 50 infectés tombèrent malades (7,4 p. 100) et des 570 non infectés 62 ou 10,8 p. 100.

Comme nous le voyons, la différence entre les infectés et les non infectés est minime : elle est de 0 pour les vaccinés et de 8 p. 100 pour les non vaccinés.

II. — VACCINATION PAR LE SANG ATTÉNUÉ A LA GLACIÈRE.

En 1903, Lignières a remarqué que le sang parasité conservé pendant trente jours à la température de 5° à 8° ne détermine qu'une réaction modérée chez les animaux. Ce fut le premier

vaccin qui consistait à injecter 10 cent. cubes de sang à *Piroplasma bigeminum*, conservé trente jours dans la glacière. L'animal avait plus ou moins réagi. Quinze jours après, on inoculait sous la peau 1 cent. cube de sang à *Piroplasma bigeminum* conservé seulement quinze jours à la glacière (second vaccin). Les animaux sont immunisés et il était impossible de leur donner la piroplasmose avec *Piroplasma bigeminum*. Mais l'auteur quelquefois avait des échecs. Ces échecs furent expliqués par la découverte d'un nouvel agent de Tristezza argentin, la *Babesiella argentina*. Les études comparées de Lignières des deux parasites avaient prouvé que *Babesiella argentina* immunise parfaitement contre *Piroplasma bigeminum*; mais celui-ci n'immunise pas très fortement contre *Babesiella argentina*, mais donne cependant une certaine résistance contre ce dernier. Il a modifié son premier vaccin : au lieu d'employer le sang conservé depuis trente jours à la glacière, il a tué les piroplasmes par la congélation, en les plaçant dans le mélange réfrigérant (sel et glace pilée) du soir au matin. Les érythrocytes sont détruits, et en injectant dans les veines 10 cent. cubes de ce sang on peut, dix jours après, inoculer l'animal sous la peau avec 1 cent. cube de sang à *Piroplasma bigeminum* conservé à la glacière quinze à vingt jours sans produire, en général, une forte réaction. Quinze jours après la deuxième injection, les animaux reçoivent encore sous la peau 1 cent. cube de sang à *Babesiella argentina*. Le premier vaccin ne provoque aucune réaction; le second peut amener la fièvre qui disparaît rapidement; le troisième est suivi de phénomènes fébriles. La mortalité ne doit pas atteindre 4 p. 100.

En Russie, Saikowitsch (gouvernement de Novgorod) a vacciné avec succès d'après la méthode de Lignières.

Cette méthode présente beaucoup de difficultés et elle n'a pas donné toute satisfaction à Lignières à cause de l'existence en Argentine d'un troisième parasite, *Anaplasma argentina*.

III. — AUTRES MÉTHODES D'IMMUNISATION.

Morgan et Hodson ont imaginé d'écraser des tiques gorgées de sang sur les animaux malades et d'en inoculer le broyage à de jeunes animaux.

Connaway et Francis ont déposé sur les animaux à vacciner les tiques infectées, dans une première intervention 20 à 30 et ensuite 200 à 400.

Motas a mélangé le sang fortement parasité avec la bile.

Tous ces procédés n'ont plus qu'un intérêt historique.

IV. — VACCINATION AVEC LE TRYPANOBLEU.

Jowett, Nuttal et Hadwen sont les premiers qui ont trouvé que la couleur de benzidine, le trypanobleu, est un produit excellent pour le traitement de la piroplasmose. Il exerce une action indiscutable sur les piroplasmes, mais la disparition des parasites n'est pas absolue : les parasites cessent d'être décelables au microscope, mais l'organisme n'est pas stérilisé. Les animaux guéris sont immunisés comme après la guérison spontanée. Les bovidés de Theiler et Stockman, de Descazeaux ont pu être par la suite exposés à l'infection naturelle sans contracter de maladie.

Mais le trypanobleu jouit encore de propriétés préventives. D'après Jowett, on peut immuniser les chiens contre la pyroplasmose en les inoculant au moyen de sang virulent et en leur administrant une dose de trypanobleu dès l'apparition des premiers symptômes et des parasites dans le sang. D'après Theiler, ce procédé est appelé à un emploi régulier pour vacciner les reproducteurs importés qui montrent une grande réceptivité à l'action de *Piroplasma bigeminum*.

Descazeaux inocule sous la peau 3 à 6 cent. cubes de sang virulent et puis dix jours après le trypanobleu dans la veine. L'immunisation est acquise de suite. Misson a obtenu par le même procédé d'excellents résultats.

Lignières, qui a eu des échecs avec ses vaccins précédents, a trouvé dans le trypanobleu la bonne méthode pour vacciner contre la Tristeza. Voici la technique de sa vaccination : *Premier vaccin*, sang à *Piroplasma bigeminum* par 5-10 cent. cubes sous la peau; *deuxième vaccin*, quinze jours après, qu'on ait donné ou non du trypanobleu aux animaux, la réaction du premier vaccin est terminée, on leur injecte sous la peau 5 à 10 cent. cubes de sang à *Piroplasma bigeminum* plus fort que celui du premier vaccin; *troisième vaccin*, lorsque quinze jours

se sont écoulés, on injecte toujours sous la peau 10 cent. cubes du troisième vaccin, qui contient à la fois *Babesiella argentina* et *Anaplasma argentinum* atténué par mouton.

« Cette méthode », — dit Vélou, du procédé de Theiler, — « est pleine de promesses, et il faut espérer que de nouvelles expériences viendront préciser les conditions dans lesquelles elle doit être appliquée pour permettre d'obtenir une immunité solide et durable contre les diverses espèces du genre *Piroplasma* ».

B. — Recherches personnelles.

I. — IMMUNISATION D'APRÈS THEILER (THEILÉRISATION).

Pour l'immunisation d'après Theiler, on fit un choix de 6 animaux. Le point capital de cette immunisation consiste en ceci :

On faisait des inoculations sous-cutanées de sang d'animaux atteints de la piroplasmose, contenant une quantité suffisante de piroplasmes. On faisait journellement l'examen du sang de chaque animal et on prenait sa température. A la première apparition de parasites dans le sang et avant l'apparition de la coloration de l'urine en rouge, on injectait dans la veine 1 gramme de trypanobléu (en solution à 1 p. 100).

IMMUNISATION. — Les parasites apparurent dans 4 cas trois jours après la première infection et dans 1 seul cas moins de deux jours après. Les animaux paraissaient en bon état, mangeaient, buvaient, avaient une température normale. Le lendemain de l'apparition des parasites, la température s'éleva dans 3 cas, et cela dura de un à quatre jours ; dans 2 cas, elle ne s'éleva pas.

On fit l'injection du trypanobléu à 3 animaux le jour même de l'apparition des parasites ; aux 2 autres, le lendemain (dans tous les cas, avant la coloration de l'urine). Le lendemain de l'injection, dans 3 cas, l'urine prit la couleur de fruits de sorbier, ce qui disparut du reste au cours de vingt-quatre heures ; dans 1 cas, l'urine devint pâle ; puis vers le second

jour foncée, ce qui disparut en quarante-huit heures. Dans 1 autre cas, hors l'apparition de parasites dans le sang et la température élevée, il n'y eut aucun autre symptôme durant toute la maladie.

VÉRIFICATION DE L'IMMUNISATION. — Pour vérifier l'immunisation, nous avons inoculé du sang infecté sous la peau après des temps définis d'avance à partir du moment de l'immunisation (de dix-sept à cinquante-six jours). Nous l'avons inoculé 2 fois à 4 animaux expérimentaux et 1 fois à 2 autres. Après la première infection de contrôle, les parasites apparurent dans 3 cas du deuxième au quatrième jour ; dans 3 autres cas, ils n'apparurent pas. De 4 animaux soumis à l'infection de contrôle pour la deuxième fois, les parasites n'apparurent que chez un. La température ne s'éleva dans aucun de ces cas.

Coloration de l'urine : Parmi les réinfectés, 7 cas sans coloration de l'urine ; 1 cas avec coloration légère, disparue en vingt-quatre heures.

Etat général : Les animaux paraissent bien, boivent et mangent.

On peut voir les résultats sur le tableau I.

Nous voyons, par tout ce qui a été mentionné ci-dessus, que l'immunisation d'après la méthode de Theiler préserve solidement contre la *Babesiella bovis*.

II. — IMMUNISATION PAR LE TRYPANOBLEU SEUL (TRYPANOBLEUNISATION).

Les auteurs allemands prétendent qu'aux premiers cas de piroplasmose dans un troupeau l'injection sous-cutanée d'une petite quantité de trypanobleu à tout le troupeau préserve ce dernier contre l'infection naturelle.

Dans l'été 1925, nous fîmes plusieurs essais d'après cette méthode.

Dans ce but, nous choisîmes 3 génisses, auxquelles nous injectâmes 1,0 gr. de trypanobleu (en solution à 1 p. 100). Un temps défini (de vingt et un jours à deux mois) s'étant passé depuis l'injection du trypanobleu, elles furent soumises à une injection sous-cutanée de sang avec les piroplasmes, l'une une fois, les deux autres deux fois. Dans les 3 cas, des piroplasmes

IMMUNISATION VIS-A-VIS DE LA PIROPLASMOSE DES BOVIDÉS 289

NOMBRE DES ANIMAUX	INFECTIONS			PARASITES		TEMPÉRATURE				HÉMOGLOBINURIE				
	Date	Pourcentage des érythrocytes parasités et quantité de sang	Nombre de jours après l'inoculation du trypanobleu	Nombre de jours après l'infection	Nombre de jours avec les parasites	Nombre de jours après l'infection où on fait l'injection du trypanobleu	Nombre de jours où la température s'élève après l'infection	Nombre de jours avec la température élevée	Nombre de jours après l'infection	Nombre de jours avec hémoglobininurie				
2	19 juin	14 p. 100. 5 c. c.		3	3	3	4	2	4	1				
	12 juillet	8,5 p. 100. 5 c. c.	48	1	6	Pas d'élévation.								
	12 août	12,8 p. 100. 5 c. c.	48	Pas de parasites.										
3	17 juin	25,3 p. 100. 10 c. c.		3	5	3	Pas d'élévation.							
	18 juillet	3,5 p. 100. 15 c. c.	28	4	2	Pas d'élévation.								
	17 juin	25,3 p. 100. 7 c. c.		2	3	2	4	1	3	1				
6	8 juillet	3,5 p. 100. 40 c. c.	17	2	1	Pas d'élévation.								
	12 août	12,8 p. 100. 10 c. c.	42	Pas de parasites.										
	26 juin	25,3 p. 100. 5 c. c.		3	3	4	4	4						
8	18 juillet	3,5 p. 100. 15 c. c.	48	Pas de parasites.										
	21 août	8 p. 100. 8 c. c.	51	Pas de parasites.										
	7 juin	3,5 p. 100. 6 c. c.		3	4	4	Pas d'élévation.							
12	24 juillet	17 p. 100. 15 c. c.	41	Pas de parasites.										
	19 juin	4 p. 100. 5 c. c.		5	1	Pas d'élévation.								
	12 juillet	8,5 p. 100. 5 c. c.	23	5	4	Pas d'élévation.								
4	12 août	12,8 p. 100. 5 c. c.	54	5	1	Pas d'élévation.								
	8 juillet : infection naturelle.													
	12 août	12,8 p. 100. 10 c. c.	34	4	1	1	4	1	2					

parurent dans le sang, la température s'éleva pendant trois à cinq jours, mais il n'y eut pas de coloration d'urine. Après la deuxième infection, la température s'éleva dans 1 cas ; mais, dans les 2 cas, il n'y eut pas de parasites dans le sang.

L'état général des animaux continua à être satisfaisant. (Tableau II.)

Pour le contrôle de cet essai, ainsi que pour le contrôle des essais d'immunisation d'après la méthode de Theiler, on avait choisi 3 génisses.

2 d'entre elles avaient été atteintes de piroplasmose naturelle en été (elles furent soumises à un traitement spécifique). L'une fut soumise à l'infection au moyen de larves d'*Ixodes ricinus*, écloses, au laboratoire même, d'œufs de femelles infectées ; la génisse prit la contagion.

TABLEAU II. — La trypanobleunisation.

NOMBRE DES ANIMAUX	DATE de l'inoculation du trypanobleu	INFECTIONS			TEMPÉRATURE		PARASITES			HÉMO-GLOBINURIE
		Date de la réinfection	Pourcentage des érythrocytes parasités et quantité de sang	Nombre de jours après l'inoculation du trypanobleu	Nombre de jours après l'infection	Nombre de jours avec la température élevée	Nombre de jours après l'infection	Nombre de jours avec les parasites	Rechutes	
10	22 juin.	12 juillet.	8,5 p. 400. 5 c. c.	20	4	3	4	4	0	0
		21 août.	18 p. 100. 8 c. c.	60	2	5	Pas de parasites.	0	0	0
11	22 juin.	24 juillet.	51 p. 400. 15 c. c.	32	2	4	1	6	0	0
		21 août.	8 p. 100. 8 c. c.	60	Pas d'élévation.		Pas de parasites.		0	0
14	22 juin.	12 juillet.	12 p. 100. 10 c. c.	61	4	5	5	3	31 août, 4 jour.	0

Ainsi, d'après nos essais, au moins chez les jeunes animaux, la trypanobleunisation confère l'immunité vis-à-vis de l'infection soit expérimentale, soit contractée dans les pâturages infectés, où les animaux de contrôle ont également pris l'infection.

Pour terminer ce chapitre, nous devons ajouter que, au cours de la grave épizootie de 1926, quand il y avait des animaux malades dans les troupeaux, aucune des génisses mentionnées ci-dessus et trypanobleunisées ne fut malade. Que cela soit dû à la chance ou à une immunité durable, nous croyons devoir signaler le fait.

Nous proposons d'appliquer au procédé d'immunisation où l'affaiblissement du virus se fait à l'aide de produits chimiothérapeutiques dans l'organisme même le terme de *chimio-immunisation*.

De même, selon nous, il ne serait que juste de désigner le procédé de Theiler — en l'honneur du savant de l'Afrique du Sud — du nom de *Theilérisation* et l'immunisation vis-à-vis de plusieurs parasites à la fois, proposée par Lignières, de celui de *Lignièresisation*.

DEUXIÈME PARTIE

IMMUNISATION PAR LE TRYPANOBLEU (TRYPANOBLEUNISATION)

Par le Professeur W. L. YAKIMOFF, M^{me} MARKOFF-PETRASCHEWSKY,
M^{lle} E. F. RASTEGAIEFF et M^{lle} A. N. GNIEDINE,
médecins-vétérinaires.

I

Tandis qu'au laboratoire du Service antipiroplasmique on faisait des essais d'immunisation par le trypanobleu seul, nous décidâmes d'éprouver ce moyen en vue de son innocuité sur le bétail de la population de sept villages du district de Lodenoié Polé (Gouvernement de Pétrograde) qui donnèrent leur consentement et où nous avons en conséquence traité 492 animaux. Aux villages Loukinskaïa, Pawlowskaïa et Woronié, la piro-

plasmosse était de date récente, n'existant pas depuis plus de deux à trois ans. Aux autres villages : Khewronino, Bourakowa Gora, Kissélewo et Peldogi, elle était d'ancienne date et sévisait déjà depuis au moins quatre à sept ans.

TABLEAU III.

NOMS des villages	ANIMAUX adultes	GÉNISSES	ANIMAUX de contrôle
Loukinskaïa	59	6	17
Pawłowskaïa	52	—	31
Woronie	45	3	71
Khewronino	72	27	12
Bourakowa Gora	81	22	14
Kissélewo	49	8	15
Peldogi	52	18	—
Total	408	84	160

Le bétail de trois villages : Boukhowa Gora (85 bêtes), Sidozero (95 bêtes) et Miatoussowo (158 bêtes), servaient de contrôle ; le bétail s'y rencontrait avec celui des villages immunisés ; outre l'ancienneté de la piroplasmose, les conditions des pâturages étaient identiques.

Ainsi, il y avait 492 animaux immunisés (408 adultes, 84 génisses) et 500 animaux de contrôle (162 dans les villages où l'immunisation avait été faite et 338 dans les autres villages).

On entreprenait la trypanobleunisation lorsqu'il y avait 1, 2 ou 3 cas de piroplasmose, ce qui arriva au commencement de juin (5 à Peldogi, de 1 à 6 à Khewronino, Bourakowa Gora, Kissélewo, Loukinskaïa, Pawłowskaïa et Woronié). On fit à chaque animal une injection de 100 cent. cubes de solution à 1 p. 100 de trypanobléu.

Dès lors, on établit une observation rigoureuse du bétail immunisé.

En 1925, la piroplasmose était très répandue dans le district de Lodenoié Polé. Le nombre des malades atteignait 818. Or, le plus grand nombre de malades parut à la dernière décade de juin et à la première de juillet. Ce fut la première poussée. La deuxième, bien plus faible, se produisit au commencement d'août. La mortalité pendant la marche naturelle de la maladie

fut de 39,8 p. 100. Le pourcentage des malades de différents villages, relativement à la quantité présente de bétail, était souvent considérable. Le voici pour les villages mentionnés ci-dessus : Zidozero, 36 p. 100; Peldogi, 25,5 p. 100; Khewronino, 23 p. 100; Miatoussowo, 20 p. 100; Bourakowa Gora, 19,8 p. 100; Boukhowa Gora, 13,9 p. 100; Woronié, 6,8 p. 100; Pawłowskaïa, 4,9 p. 100; Loukinskaïa, 3,7 p. 100 et Kissélewo, 3,4 p. 100.

Après la trypanobleunisation, quelques vaches (en très petit nombre) commencèrent à donner moins de lait et à perdre l'appétit. 46 vaches du village de Peldogi, qu'on observait avec une attention particulière, donnèrent moins de lait temporairement : 4 vaches, un tiers de moins ; 1, la moitié ; 1, un quart de moins ; 2, un peu moins ; pendant tout l'été : 4, un tiers de moins ; 3, la moitié ; 2, un quart de moins ; dans le village Khewronino, le même effet se produisit chez 15 vaches.

On ne nota rien de particulier comme état général des animaux, excepté des frissons et une certaine flaccidité qui ne dura que quelques heures et au plus deux jours.

A l'endroit de l'injection, il se produisait parfois une tumeur ; ce fut le cas chez 20 animaux sur 313 du village Khewronino et chez 4 sur 52 de Peldogi. Les tumeurs — généralement minimales — passaient très vite, mais il y eut 5 cas où apparut deux semaines plus tard un abcès qui passa sans suites après le traitement habituel.

Dans la région de Khewronino, 4 animaux avaient une température élevée ; néanmoins on leur injecta la même quantité de trypanobleu, en les tenant sous surveillance. Trois heures après l'injection, 3 vaches eurent l'urine rouge, ce qui dura douze heures ; leur état général était semblable à celui qui accompagne la piroplasmose. Les deux autres vaches n'eurent pas l'urine rouge. Il faut supposer qu'au moment de la trypanobleunisation ces dernières passaient par la période d'incubation de la maladie naturelle.

Quels ont donc été les résultats de la trypanobleunisation ?

Dès le mois de juin, il y eut, parmi les animaux immunisés, plusieurs cas de piroplasmose. Dès l'apparition de la maladie à Peldogi, les vaches malades furent soumises à un traitement spécifique. En juin sur 6 malades, 5 furent traités en l'absence

du chef (Prof. Yakimoff) et à son insu, et toutes les 5 se remirent. Le pourcentage d'infection des érythrocytes fut de 1 à 14,2, en moyenne 4,5. L'urine rouge se maintint de vingt-quatre à soixante-douze heures, en moyenne trente-huit heures. Les animaux allaient bien, mangeaient, buvaient et supportaient la maladie facilement, excepté un qui mourut (l'infection était minime, mais à l'autopsie on constata de l'artériosclérose).

Plus tard on abandonna le traitement spécifique et en juillet 4 des cinq vaches ne furent plus traitées; on ne traita qu'une seule (à cause du grand nombre de malades et du manque absolu de temps pour des visites fréquentes). Le pourcentage des érythrocytes parasités était de 1 à 14,2, en moyenne 4,1. L'urine rouge se maintint de dix à soixante-douze heures, en moyenne trente-cinq. Les animaux allaient bien, mangeaient, buvaient et supportaient la maladie facilement.

En août, à l'époque de « la courbe d'août », la maladie prit un caractère très sérieux autant parmi les animaux non immunisés que parmi les immunisés. Le pourcentage des érythrocytes parasités fut de 1 à 22, en moyenne 15,6; la coloration de l'urine chez les immunisés se maintint de douze à quatre-vingt-seize heures, trente-huit heures en moyenne. Au commencement du mois, nous eûmes deux vaches, non traitées spécifiquement, chez lesquelles l'urine rouge se maintint pendant quatre jours; le degré d'épuisement fut très grand et le nombre des érythrocytes diminua brusquement (1.268.000 par millimètre cube au lieu des 6-7 millions habituels); l'état général ne redevint normal qu'après une semaine. Dans un autre cas, le pourcentage des érythrocytes parasités fut 30, pendant deux jours; le deuxième jour on fit une injection sous-cutanée d'arrhéнал; le cas était grave; faiblesse, affaiblissement du cœur, la vache succomba le troisième jour; à l'autopsie on constata la surcharge du feuillet et des phénomènes de la piroplasmose. Vu la gravité de la maladie nous nous mîmes à traiter les animaux immunisés malades. A la fin d'août, malgré un traitement spécifique, la maladie prit un caractère des plus graves; dans un cas, par exemple, il fallut répéter l'injection dans les quarante-huit heures à cause de la non-disparition des parasites du sang; la coloration de l'urine se prolongea quatre jours; le nombre des érythrocytes

TABLEAU IV. — Région du village de Peldogl.

MOIS ET DÉCADES	NOMBRE TOTAL des malades			TRAITÉS SPÉCIFIQUEMENT						NON TRAITÉS					
	Génisses	Adultes	Total	Nombre total			Morts			Nombre total			Morts		
				Génisses	Adultes	Total	Génisses	Adultes	Total	Génisses	Adultes	Total	Génisses	Adultes	Total
<i>Juin.</i>															
1-10		1	1		1	1									
11-20		2	3		2	3		1	1						
21-30	1	2	2	1	1	1					1	1			
Total	1	5	6	1	4	5		1	1		1	1			
<i>Juillet.</i>															
1-10	2		2												
11-20	1	1	2			1					1	1			
21-31		1	1								1	2			
Total	3	2	5			1					3	1			
<i>Août.</i>															
1-10	1	1	2												
11-20		3	3		2	2		1	1		1	1			
21-31	2	1	2	1	1	2						1			
Total	2	5	7	1	3	4			1		1	2			
Total général.	6	12	18	3	7	10		2	2		4	4			

tomba à 2.000.000; convalescence lente; anémie; faiblesse.

Parmi les immunisés, il y eut en tout 18 malades.

Pendant trois mois, on remarqua une différence dans le degré de morbidité. En juin et juillet le pourcentage moyen des érythrocytes parasités fut de 4,5 et de 4,1; en août ce pourcentage s'accrut presque quatre fois comparativement aux précédents, le nombre des heures avec l'urine rouge s'accrut jusqu'à cinquante-huit; la maladie devint grave.

Nous avons fait en même temps des recherches sur la formule leucocytaire et la formule d'Arneth des 53 animaux immunisés. Dans la formule leucocytaire de 60 p. 100, il y eut une modification vers l'augmentation du pourcentage des lymphocytes (de 30 à 60 p. 100) et de la diminution du pourcentage des polynucléaires neutrophiles (de 60 à 15 p. 100). La formule d'Arneth montra un déplacement net à gauche dans le sens de l'augmentation du pourcentage des éléments bi- et trinucclés et de la diminution des éléments 4, 5 et 6 nucléés. Nous trouvâmes généralement le même tableau dans les formules leucocytaires d'Arneth pendant la piroplasmose.

Le tableau IV donne la morbidité décrite à peine chez le bétail immunisé de Peldogi.

On voit que, des 18 animaux malades, 10 seulement furent traités, 2 d'entre eux succombèrent, 8 ne furent pas traités, il n'en succomba aucun. Cette différence s'explique par le fait que nous avons traité seulement les malades graves; les animaux légèrement malades ne furent pas traités du tout.

18 animaux malades sur 70 immunisés font 25,7 p. 100; deux morts parmi les immunisés font relativement au nombre général des immunisés (70) 2,8 p. 100; relativement au nombre des malades (18) 11 p. 100.

II

Dans la région de Khewronino (Khewronino, Boukhowa Gora et Kissélewo), on vaccina 259 animaux (202 adultes et 57 génisses). La maladie apparut à la deuxième décade de juin. La plus haute courbe de morbidité tomba sur la première décade de juillet.

L'infection des érythrocytes fut en juin de 0,7 p. 100 à

TABLEAU V. — Région du village de K'heuronino.

MOIS ET DÉCADES	NOMBRE TOTAL des malades				TRAITÉS SPÉCIFIQUEMENT				NON TRAITÉS					
	Jusqu'à un an et demi	Génisses	Adultes	Total	Nombre total				Nombre total				Morts	
					Jusqu'à un an et demi	Génisses	Adultes	Total	Jusqu'à un an et demi	Génisses	Adultes	Total	Jusqu'à un an et demi	Génisses
<i>Juin.</i>														
11-20 . . .			4	4			1	1			3	3		
21-30 . . .			4	4			2	2			2	2		
Total . . .			8	8			3	3			5	5		
<i>Juillet.</i>														
1-10 . . .	1	1	10	12	1	1	10	12			3	4		
11-20 . . .	1	3	3	4							1	4		
21-30 . . .	3	1	1	4							3	4		
Total . . .	5	1	14	20	1	1	10	12			4	8		
<i>Août.</i>														
1-10 . . .		3	4	7							4	7		
11-20 . . .		2	2	4							2	4		
21-30 . . .		1	6	7			2	2			1	5		
Total . . .		6	12	18			2	2			6	16		
<i>Septembre.</i>														
1-10 . . .		1	6	7			5	5			1	2		
Total général .	5	8	40	53	1	1	20	22			11	31		
											4	5		

16 p. 100, en moyenne 9,7 p. 100 ; en juillet de 1 p. 100 à 28 p. 100, en moyenne 14,1 p. 100 ; en août de 4,2 p. 100 à 38,8 p. 100, en moyenne 12,3 p. 100 ; en septembre de 5,6 p. 100 à 10,7 p. 100, en moyenne 7,2 p. 100.

Nous voyons ici le même tableau qu'à Peldogi. La plupart des animaux avaient une urine colorée ; chez les animaux non soumis à un traitement spécifique, ce symptôme disparaissait après deux ou deux jours et demi.

Quand la piroplasmose ne se complique pas d'une autre maladie, les jeunes animaux d'un an et demi et les génisses supportent la maladie bien plus facilement que les vaches ; ces dernières sont toujours très gravement malades, même quand elles se remettent. Néanmoins il a fallu avoir recours au traitement ; de 53 malades 26 furent traitées. On en traita 15 en juin et pendant la première décade de juillet.

Pendant cette période, aucune des vaches traitées ne périt. Quant aux vaches non traitées, il en périt deux. Pendant les dernières décades de juillet et les deux premières décades d'août, aucun traitement ne fut entrepris et 2 vaches seulement mouraient. Vu les malades graves d'août et de septembre, on traita 7 vaches parmi les 14 malades ; aucune d'entre elles ne succomba ; il fut de même avec les vaches non traitées.

Ainsi, des 53 vaches malades immunisées, on traita 22, dont aucune ne périt ; il y eut 31 malades non traitées dont 5 succombèrent.

Par conséquent les 53 animaux malades font 14 p. 100 relativement aux 376 animaux immunisés. Les 5 animaux immunisés qui succombèrent font relativement au nombre total des immunisés (376) 1,3 p. 100 et relativement au nombre des 53 malades immunisés, 9,4 p. 100.

Le tableau V détaille la morbidité dans la région de Khewro-nino, décrite dans ce chapitre.

III

Tout ce qui a été dit ci-dessus concerne les villages (Khewro-nino, Boukhowa Gora, Kissélewo et Peldogi), où la piroplasmose sévit depuis au moins quatre à sept ans.

Nous voyons tout autre chose dans deux villages, où la piro-

TABLEAU VI.

NOMS DES VILLAGES IMMUNISÉS	BÉTAIL IMMUNISÉ			BÉTAIL NON IMMUNISÉ		
	Nombre d'animaux	Nombre des malades	Pourcentage des malades	Nombre d'animaux	Nombre des malades	Pourcentage des malades
A. — Villages ayant la piroplasmose de deux à trois ans.						
Loukinskaïa	59	2	3	17	0	0
Pawłowskaia	52	0	0	31	4	12,9
Boukhowa Gora	—	—	—	25	16	18,8
Sidozero	—	—	—	95	50	52,5
Woronié	43	3	6,9	71	13	18,3
Total	154	5	3,2	299	83	27,7
B. — Villages ayant la piroplasmose de quatre à sept ans.						
Khewronino	72	18	25	12	2	16,6
Bourakowa Gora	81	18	22,2	16	4	25,2
Kissélewo	49	2	4	15	0	0
Peldogi	52	11 (2)	21,1	—	—	—
Miatoussowo	—	—	—	158	37	23,3
Total	254	49	19,2	201	43	21,3

plasmose est pour ainsi dire « récente », n'y existant pas depuis plus de deux à trois ans (villages Loukinskaïa et Pawlowskaïa, qui se trouvent l'un près de l'autre, ainsi que Woronié). Nous voyons par le tableau VI qu'à Loukinskaïa de 59 vaches vaccinées 2 seulement furent malades (3 p. 100) et aucune ne succomba; à Pawlowskaïa, de 53 aucune ne fut malade. A Woronié, qui est éloigné des deux villages précédents (il est situé à 22 kilomètres, au bord du fleuve Swir en remontant son cours), sur 43 vaches vaccinées, 3 furent malades (6,9 p. 100) et de 71 non vaccinées, seulement 13 (18,3 p. 100). Toutes les vaches de ces trois villages furent malades légèrement.

Nous voyons donc que l'immunisation a donné de meilleurs résultats dans les villages où la piroplasmose a paru depuis peu (moins de deux, trois ans), que dans ceux où l'épizootie s'est établie depuis longtemps (depuis au moins quatre à sept ans).

Pour l'appréciation définitive des résultats obtenus, nous nous basons principalement sur les animaux jeunes et les génisses ont la maladie sous forme légère.

Le résumé définitif paraît sur le tableau VI.

Quels sont les résultats de la trypanobleunisation en 1926?

On voit les résultats sur le tableau VII.

Nous voyons que l'année suivante l'immunité ne se conserve plus. Dans les villages du premier groupe, le pourcentage des malades en 1926 est plus grand qu'en 1925, tandis que, dans les villages du deuxième groupe, il est plus petit que celui de l'année passée.

Premier groupe :

En 1925 : 1,8 p. 100.

En 1926 : 7,4 p. 100.

Deuxième groupe :

En 1925 : 19,2 p. 100.

En 1926 : 14,4 p. 100.

Quant au bétail non immunisé, il y eut plus de malades en 1926 qu'en 1925 (du fait du jeune bétail grandissant) :

Premier groupe :

En 1925 : 8,3 p. 100.

En 1926 : 50 p. 100.

Deuxième groupe :

En 1925 : 13,9 p. 100.

En 1926 : 27 p. 100.

TABLEAU VII.

	1925						1926					
	BOVIDÉS IMMUNISÉS			BOVIDÉS DE CONTRÔLE			BOVIDÉS IMMUNISÉS			BOVIDÉS DE CONTRÔLE		
	Nombre d'immunisés	Nombre de malades	Pourcentage des malades	Nombre d'animaux	Nombre de malades	Pourcentage des malades	Nombre d'immunisés	Nombre de malades	Pourcentage des malades	Nombre d'animaux	Nombre de malades	Pourcentage des malades
I. — Villages ayant la piroplasmose récente.												
Loukinskaïa	59	2	3,3	47	0	0	59	8	13,8	4	2	50
Pawłowskaïa	52	0	0	31	4	12,9	53	0	0	10	5	50
Total	111	2	1,8	48	4	8,3	112	8	7,1	14	7	50
II. — Villages ayant la piroplasmose vieille.												
Khevronino	72	48	25	12	2	16,6	58	13	22,4	13	5	38,9
Bourakowa Gora	81	48	22,2	46	4	22,2	67	41	46	44	4	9
Kissélevo	49	2	4	45	0	0	49	4	2	6	0	0
Grand Peldogi	52	4	21,7	—	—	—	59	8	13,5	17	7	41,4
Total	254	49	19,2	43	6	13,9	233	33	14,1	47	13	27

TROISIÈME PARTIE

IMMUNISATION D'APRÈS LE PROCÉDÉ DE THEILER
(THEILÉRISATION)

par le Prof. W. L. YAKIMOFF, M^{me} E. N. MARKOFF-PETRASCHEWSKY
et M^{lle} E. F. RASTEGAIEFF, médecins-vétérinaires.

I

Dans le premier article de ce travail, nous avons déjà parlé des principes d'immunisation d'après Theiler. Ils consistent en ceci, qu'au lieu d'introduire dans l'organisme un virus affaibli (par exemple, sous forme de sang d'animaux ayant eu la maladie), on affaiblit le virus dans l'organisme même. Le trypanobleu, introduit quelques jours après l'infection par le virus naturel, au moment même où les parasites apparaissent dans le sang, coupe l'accès aigu de la maladie et donne à l'organisme une maladie chronique bénigne, ne produisant pas d'action nuisible sur l'organisme des animaux. Et comme les piroplasmes, soumis à l'effet du trypanobleu, ne disparaissent jamais entièrement de l'organisme (d'après la théorie de Nuttall, le trypanobleu ne fait qu'inhiber le développement des parasites, agissant sur les formes de division), ils existent en petit nombre dans l'organisme (sous formes annulaires), empêchant une nouvelle infection.

Ce procédé a été adopté dans l'Afrique du Sud et dans l'Amérique du Sud (Brésil, Argentine). Aucun animal arrivé d'Europe en qualité de reproducteur ne passe des ports à l'intérieur du pays, où il serait certainement la proie de la piroplasmose locale, sans avoir été immunisé contre ce mal par le procédé de Theiler.

D'ailleurs cette méthode d'immunisation s'applique seulement vis-à-vis de la *Piroplasma bigeminum*. On peut se demander si elle est aussi efficace vis-à-vis de la *Babesiella bovis*, bien que Lignières ait immunisé par ce procédé non seulement vis-à-vis de la *Piroplasma bigeminum* d'Argentine, mais aussi vis-à-vis de la *B. argentina* et même vis-à-vis des anaplasmes. Nos

propres travaux ont fourni la preuve que cette immunisation est tout aussi efficace vis-à-vis de la *B. bovis*.

Dans notre premier article, nous avons décrit nos expériences avec les animaux de laboratoire, qui nous ont donné de bons résultats, malgré l'infection de contrôle, faite une et souvent même deux fois avec un virus très fort dix-sept et cinquante-six jours après l'injection du trypanobleu et malgré le séjour de ces animaux dans un pâturage infecté de tiques pendant tout l'été. Cependant les animaux de contrôle prirent l'infection.

Nous pouvions donc compter que l'immunisation d'après Theiler, faite aux animaux de la grande masse des troupeaux, nous donnerait de bons résultats. Aussi avons-nous exécuté notre intention pendant l'été 1926 au district de Lodenoié Polé.

A proprement parler, notre vaccination ne peut être nommée strictement préservatrice, car elle a été faite pendant l'épizootie même de piroplasmose; il faudrait plutôt la nommer « obligatoire ». Cependant cette dénomination ne convient pas entièrement, car nous séparions du troupeau les animaux qui étaient à la période d'incubation et les traitions de la manière habituelle (ichthargan).

Au commencement, nous fûmes à la lettre obligés d'avancer à tâtons, ne pouvant guère trouver dans la bibliographie de description détaillée de la technique de la vaccination; aussi avons-nous été obligés de chercher nous-mêmes la dose de sang infectieux défibriné pour produire l'infection; en plus, il fallut mesurer la température au moins deux fois par jour, examiner microscopiquement les frottis de sang au sujet de piroplasmes au moins une fois par jour, afin de ne pas laisser échapper le moment voulu pour l'injection du produit; ensuite observer les animaux pendant la période post-vaccinale, enfin, combiner toute la masse de chances possibles. Cela rendait notre travail au début du moins très énervant et fébrile.

C'est dans ces conditions-là que se fit notre tout premier travail au village de Pidma (rayon de Podporojé).

Une fois que nous eûmes pour base l'expérience de ce village, il fut déjà plus facile de travailler à Pidmozéro, Peldogi, Schang-Ostrow et Wolostnoi Nawolok.

Nous obtenions d'animaux atteints de maladie naturelle le virus nécessaire pour la vaccination, nous tâchions aussi de nous servir d'un virus local, c'est-à-dire du même village où nous faisons de la vaccination; cependant parfois, n'ayant pas d'animal malade à notre disposition, nous étions obligés de nous servir de sang pris ailleurs.

Nous employions en qualité de virus le sang défibriné d'un animal malade quelconque; en ce cas nous déterminions le pourcentage de l'infection des érythrocytes. Nous fondant sur nos expériences avec les animaux de laboratoire en 1925, nous savions qu'avec la quantité de sang défibriné que nous injections (3, 5, 7 et 10 cent. cubes indépendamment du degré d'infection, nous avions alors du sang à 3, 5, 14 et 25 pour 100) les piroplasmes apparaissent dans la circulation sanguine générale après trois jours^[1] (d'après Kossel, Weber, Schütz et Miesner, après l'injection sous-cutanée de 10 cent. cubes de sang, les parasites apparaissent dans le sang en dix jours; après l'injection intraveineuse de 20 cent. cubes en deux jours).

II

DOSE, POURCENTAGE DES ÉRYTHROCYTES PARASITÉS, PÉRIODE D'INCUBATION. — Au début de nos travaux, nous nous heurtâmes à toute une série d'embarras et de surprises relativement à la dose et à la période d'incubation. C'est ainsi que, dans le premier troupeau au village de Pidma, on injecta à chaque animal 3 cent. cubes de sang mélangé (21,3 p. 100 des érythrocytes infectés). Période d'incubation de neuf à onze jours (2).

On injecta au deuxième troupeau du même village 3 p. 100 de sang de deux vaches du village de Sidozero avec 10,3 p. 100 d'infection. La période d'incubation fut semblable à la précédente de huit à dix jours.

(1) Par exemple : I. *Génisse* n° 3 : 17 juin, injection de 10 p. 100 de sang avec 25,3 p. 100 d'infection. Les parasites apparurent en trois jours.

II. *Génisse* n° 8 : 26 juin, injection de 3 cent. cubes de sang avec le même pourcentage d'infection. Les parasites apparurent en trois jours.

III. *Génisse* n° 12 : 7 juin, injection de 6 cent. cubes avec 3,5 p. 100 d'infection. Les parasites apparurent en trois jours.

(2) Nous devons prévenir, une fois pour toutes, que nous comptons comme période d'incubation le temps depuis le moment de l'infection jusqu'à l'apparition dans le sang des formes annulaires.

Le troisième troupeau fut infecté de sang d'origine variée avec pourcentage d'infection : 9,4, 16,9, 16,2 et moins. Quantité de sang : 3 et 5 cent. cubes. Période d'incubation, six-huit jours. Nous devons signaler ce qui suit : tandis que, dans les deux premiers troupeaux, nous n'attendions pas l'apparition dans le sang des formes en poires et injections le produit dès que nous voyions apparaître dans le sang les formes annulaires, nous étions souvent obligés pour des raisons qui ne dépendaient pas de nous de laisser passer pour le troisième troupeau le moment de l'apparition des formes annulaires pour nous heurter à la forme suivante de parasites en poires. De cette manière, le moment le plus proche pour la terminaison de la période d'incubation était ici de cinq à six jours.

Le quatrième troupeau fut infecté de sang d'origine variée, mais du même village de Pidma (4,7 et 12,9 p. 100 des érythrocytes parasités). La dose de sang était de 5 cent. cubes, la même pour tous les animaux; et néanmoins dans les deux cas la période d'incubation fut de quatre à six jours.

Ainsi, la période d'incubation dans le cas d'infection artificielle à l'aide d'injections sous-cutanées de sang (on peut voir ici que le pourcentage de l'infection des érythrocytes et la dose de sang n'ont qu'une petite importance) était au minimum de quatre jours et au maximum de onze.

Nous basant sur notre expérience, comparativement grande (140 animaux), nous avons décidé de nous guider à l'avenir sur les points suivants : ne pas injecter au delà de 3 cent. cubes; nous servir d'un pourcentage d'infection ne dépassant pas 10 et n'étant pas moins de 5 p. 100.

Aux bords du lac de Pidmozéro, l'immunisation fut faite dans quatre villages : au Grand Peldogi, Schang-Ostrow, Petit Peldogi et Wolostnoï Nawolok.

Au Grand Peldogi et à Schang-Ostrow on injecta un mélange de 3 virus d'origine locale. Les pourcentages de l'infection des érythrocytes de ce mélange étaient 3,3 et 7,2. Cependant, dans les deux villages, la période d'incubation fut de quatre jours.

Au village de Wolostnoï Nawolok, on injecta 3 cent. cubes de sang mélangé d'origine locale; ce mélange avait 5,4 p. 100 d'infection des érythrocytes. La période d'incubation fut de quatre jours.

Au Petit Peldogi, on injecta 3 cent. cubes de sang d'origine locale avec 4,4 p. 100 d'infection des érythrocytes. On ne peut rien dire ici de la période d'incubation, car l'immunisation se faisait presque simultanément (on injectait le produit vingt-quatre heures après l'infection).

PRODUITS. — Dans le procédé classique de Theiler on injecte le trypanobléu dans la veine. Cependant on peut faire les injections de trypanobléu seulement aux animaux qui ne seront pas employés comme viande, car le consommateur dédaignerait certainement la viande colorée en bleu. Aussi avons-nous également recours à l'ichthargan. Pour l'injection intraveineuse, la dose était : pour le trypanobléu 2,25 grammes dans 150 cent. cubes d'eau physiologique et pour l'ichthargan 1 gramme en solution aqueuse à 1 p. 100. Cependant, désirant simplifier ce procédé encore davantage, nous nous mîmes à chercher s'il n'était pas possible de remplacer les injections intraveineuses par des injections sous-cutanées; mais comme il n'y a pas moyen de faire des injections sous-cutanées de trypanobléu et d'ichthargan, nous nous arrê tâmes à l'arrhéнал (3 grammes dans 20 à 30 cent. cubes d'eau). Nous verrons plus loin quels résultats nous avons obtenus après l'application de ces trois produits.

PROCÉDÉS. — Lignières injecte le trypanobléu quatre-cinq jours après l'infection. Nous avons vu plus haut que, chez nos animaux, la période d'incubation durait au moins quatre jours. Cependant nous nous demandions si l'on ne pourrait pas faire l'injection peu après l'infection, sans attendre la fin de la période d'incubation. Mais puisque, d'après la théorie de Nuttall, les produits chimo-thérapeutiques ne font qu'arrêter le développement des parasites sans les tuer complètement, ne pourrait-on pas se contenter de la quantité de parasites introduits pour transformer l'infection aiguë en infection chronique et, de cette façon, préserver l'animal contre une nouvelle infection?

Nous verrons plus loin que le procédé simultané, comme nous l'avons nommé, est bien inférieur au procédé classique de Theiler, bien qu'il soit cependant possible de s'en servir.

TECHNIQUE. — Voici notre technique de vaccination d'après le procédé de Theiler.

On injectait à l'animal telle ou telle quantité de sang défibriné. Avant l'infection on prenait des frottis de sang pour voir s'il n'y avait pas des animaux se trouvant dans la période d'incubation. En effet, nous en avons trouvé quelques-uns; mais seulement le deuxième ou le troisième jour après l'infection, nous avons découvert des parasites chez un certain nombre.

Infectés : 1° Au village de Pidma : 153 animaux, dont 15 à la période d'incubation;

2° Au village d'Ostrow : 40 animaux, dont 3 à la période d'incubation;

3° Au village de Grand Peldogi : 20 animaux, dont 1 à la période d'incubation;

4° Au village de Petit Peldogi : 21 animaux, dont 1 à la période d'incubation.

Ainsi, de toute la quantité d'infectés, il y en eut 20 en période d'incubation. Par conséquent, nous avons conféré à ces animaux ce que les savants étrangers appellent la *super-infection*.

Nous avons exclu ces animaux du nombre des animaux immunisés et les considérâmes comme atteints de maladie naturelle et exigeant un traitement spécifique (ils se remirent tous). On mesurait la température des animaux infectés deux fois par jour et on prenait une ou deux fois par jour des frottis de sang qu'on examinait au sujet des piroplasmes. Dès que nous trouvions sur les frottis des formes annulaires, nous leur injections le même jour tel ou tel produit. Notre travail étant extrêmement précipité, il y a eu des cas où nous avons laissé passer les formes annulaires et nous nous heurtions en conséquence à des formes en poires. Dans ces cas, il n'y avait plus aucune raison de nous laisser retenir par différentes injections, car la présence des formes annulaires est une preuve de l'apparition de l'hémoglobinurie le même jour ou le lendemain.

Comme nous l'avons dit plus haut, nous nous servions des produits suivants : du trypanobléu et de l'ichthargan pour injections intraveineuses et de l'arrhénal pour injections sous-

cutanées. Il fallut toujours nous hâter avec les injections, car tous les animaux devaient être traités au cours de vingt-quatre heures. Ainsi à Pidma on fit en un seul jour des injections à 54 animaux; le deuxième jour à 33; le troisième à 52; il en fut de même pour les autres villages.

Avec l'apparition des formes annulaires, la température ne s'élève généralement pas; elle s'élève ordinairement avec l'apparition des formes en poires, accompagnées parfois de coloration de l'urine en rouge. Si la température était élevée, elle baisse le deuxième jour après l'injection dans la plupart des cas, et, dans tous, le troisième. Les parasites disparaissent à des époques différentes après l'injection : depuis quelques heures jusqu'à vingt-quatre et trente heures (dans le dernier cas, il s'agit des formes en poires). Dans certains cas, on voit après l'immunisation la coloration de l'urine en rouge, ce qui nous est arrivé dans 16 cas à Pidma et à Ostrow (3 cas après le trypanobleu, 12 cas après l'ichthargan, 1 cas après l'arrhéнал). On observait ce phénomène à différentes époques après l'injection — depuis vingt-quatre heures à neuf jours (mais dans la plupart des cas après quarante-huit heures); l'urine se décolore à des époques différentes — de trois à quarante-huit heures du moment de son apparition. Dans un cas, ce phénomène se prolongea trois jours; dans un autre cas, cinq jours; la température ne s'élève généralement pas; les animaux se sentaient bien, buvaient, mangeaient et allaient paître au pâturage.

VALEUR DES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'IMMUNISATION. — Nous devons juger des résultats obtenus sous deux points de vue : 1° au point de vue de la méthode; 2° au point de vue des produits.

Nous avons appliqué deux méthodes :

1° La méthode *classique* de Theiler qui consiste en ce qu'on infecte l'animal au moyen de virus et que, lorsque des parasites apparaissent dans le sang (formes annulaires), on lui injecte un produit; nous introduisons de cette façon trois produits et chacun de manière différente : le trypanobleu et l'ichthargan par injection intraveineuse et l'arrhéнал par injection sous-cutanée; l'injection de trypanobleu (68 animaux au village de

Pidma, 20 au village de Peldogi et 38 au village d'Ostrow; 126 animaux en tout); la coloration de l'urine en rouge parut, suite de l'injection du produit seulement trois fois (2,4 p. 100 du nombre des vaccinés). Après l'injection d'ichthargan (68 animaux au village de Pidma), l'urine rouge apparut douze fois (dans 17,6 p. 100 relativement au nombre total des vaccinés).

Au cours de toute la période post-vaccinale jusqu'en automne, aucun des animaux ne fut malade, à l'exception d'un seul chez lequel on avait trouvé pendant tout l'été des formes annulaires; aussi regardons-nous ce cas non comme une réinfection mais comme une récurrence; la coloration de l'urine s'est prolongée seulement vingt-quatre heures, sans élévation de température et sans rien modifier aux signes de bonne santé.

Ainsi, ces 194 animaux, traités par le trypanoblu et l'ichthargan, nous ont donné des preuves d'immunisation vis-à-vis de *Babesiella bovis*.

Les plus mauvais résultats ont été obtenus avec l'arrhéнал, non dans le sens de résultats définitifs de l'immunité conférée, mais vu les circonstances qui accompagnaient ces immunisations.

Nous avons éprouvé ce procédé sur 20 animaux, dont 14 avaient dix ans et 6 davantage (jusqu'à dix-sept). La coloration de l'urine après l'injection apparut chez 14, dont 5 furent gravement malades (2 succombèrent, l'un âgé de douze ans, l'autre de quatorze), 3 avec gravité moyenne et 6 légèrement (70 p. 100).

Il est vrai qu'aux 18 qui ont survécu nous avons conféré l'immunité pour l'avenir, néanmoins il faut abandonner cette méthode en raison de la maladie plus ou moins grave qui suit l'immunisation.

Ainsi, notre désir de simplifier la méthode de Theiler en remplaçant les injections intraveineuses par des injections sous-cutanées d'arrhéнал a échoué. Il y a des limites qu'on ne peut pas enfreindre, même en biologie.

PROCÉDÉ SIMULTANÉ. — Nous avons décidé d'appliquer ce procédé dans le même but de simplifier la méthode classique de Theiler. Au lieu d'attendre l'apparition des parasites dans le

sang et ensuite de traiter au moyen de produits, ce qui peut se faire quelque temps après l'infection, nous avons commencé à injecter le produit le lendemain même de l'infection. Nous avons immunisé de cette façon 20 animaux en nous servant d'ichthargan. Parmi les 20 immunisés, 14 (70 p. 100) ont eu l'urine rouge pendant cinq à huit jours, elle disparut deux-trois jours plus tard. Tous les animaux ont eu une maladie légère (excepté l'une des vaches, qui souffrait d'une constipation tenace). Ils ont tous obtenu une immunisation solide et aucun d'entre eux ne fut malade jusqu'en automne.

III

Faisons à présent une courte description de notre troisième travail dans les villages où fut produite l'immunisation.

1° Au village de *Pidma* : Nombre total du bétail au village depuis un an et demi ; génisses, 82 ; vaches, 408 ; et taureaux, 10. Au total, 500 animaux. Ils sont partagés en quatre troupeaux : 1° Répnikow Konietz, 2° Iwanowskaïa et Oust-Pidma, 3° Issakowskaïa et Iourkowskaïa et 4° Grischinskaïa. L'épizootie piroplasmique en 1926 a éclaté au village le 9 juin. Jusqu'au début des vaccinations (le 16 juin), 15 animaux tombèrent malades.

L'infection fut faite dans le *premier troupeau* (Répnikow Konietz) le 16 juin à 38 animaux, dont 2 furent exclus (période d'incubation). Virus du même village : mélange du sang des vaches n^{os} 10 et 16 (infection des érythrocytes du mélange, 21,3 p. 100). Quantité : injection sous-cutanée de 3 cent. cubes. Les premiers parasites apparurent le 25 juin (tous avaient des formes annulaires, une seule des formes en poires en plus).

Le 25 juin, l'inoculation fut faite à 10 animaux, le 26 à 14, le 27 à 15 ; on injecta à tous du trypanoblu. Au moment de la vaccination, température 39° et plus chez 10 animaux. Aucun animal n'eut la coloration de l'urine en rouge, ni les jours suivant l'immunisation, ni plus tard.

Deuxième troupeau (Iwanowskaïa et Oust-Pidma), le 17 juin, infecté 28 animaux. Virus pris du village de Sidozero des vaches n^o 4 (10,5 p. 100 d'infection des érythrocytes) et n^o 5 (11, 2 p. 100 d'infection) ; il fut pris le 14 juin à 8 heures du

soir et tenu depuis à la glace; avant l'infection, éprouvé au sujet de la pureté; quantité, 3 cent. cubes par injection sous-cutanée; pourcentage d'infection du mélange, 10,3 p. 100. Premiers parasites (formes annulaires chez tous les animaux) observés le 25 juin. Ce jour-là première injection de trypanobleu à 5 animaux et d'ichthargan à 1 animal; le 26 juin, injection de trypanobleu à 2 animaux et d'arrhéнал à 4 animal; le 27 juin, injection de trypanobleu à 4 animaux, d'ichthargan à 13, d'arrhéнал à 2. Au moment de l'injection, température 39° et davantage chez 15 animaux. Les jours suivants, coloration de l'urine en rouge chez aucun des animaux. Cinquante-cinq jours plus tard, coloration de l'urine chez une vache (n° 47), immunisée par le trypanobleu, élévation de température, 68 p. 100 des érythrocytes parasités presque tous annulaires. Tous les symptômes disparurent en moins de douze heures. On ne peut pas parler d'une infection nouvelle; c'est une récidive, vu que, pendant toute la durée de l'immunisation jusqu'à la récidive, il y avait dans le sang des formes annulaires.

Troisième troupeau (Issakowskaja et Iourkowskaja). L'infection fut faite le 19 juin à 62 animaux, à l'exclusion de 12 qui étaient à la période d'incubation. Virus d'origines différentes : 1° du village *Miatoussowo* n° 12, 9,4 p. 100 des érythrocytes parasités; infecté 14 animaux; n° 13, 16,9 p. 100 d'infection; infecté 5 animaux; n° 14, 16,2 p. 100 d'infection, infecté 17 animaux; 2° *Pidma*, N° 18, infection des érythrocytes très légère, infecté 14 animaux; quantité de sang, 3 cent. cubes à 15 animaux, 4 cent. cubes à 34 animaux, 5 cent. cubes à 1. Les premiers parasites (formes annulaires) apparurent le 24 juin chez 12 animaux; cependant, pour certaines raisons, les injections furent faites les trois jours suivants (les 25, 26 et 27). Injection de trypanobleu à 15 animaux, d'ichthargan aux autres. Vu le retard des injections à quelques animaux (17), ils eurent la coloration de l'urine en rouge, disparue de deux à trente-six heures après l'injection; les animaux se sentaient bien, buvaient, mangeaient. Pendant les heures et les jours qui suivirent l'immunisation, la coloration de l'urine parut chez 6 animaux; elle disparut au cours des dix-huit heures après son apparition, se maintenant seulement chez 2 animaux de deux à quatre jours; tous les animaux se sentaient bien.

Quatrième troupeau (Grischinskaïa). 21 juin, infecté 26 animaux; l'un exclu comme étant dans la période d'incubation. Virus local des vaches n° 26 (infection des érythrocytes 4,7 p. 100) et n° 30 (infection 12,9 p. 100). Quantité de sang pour tous les animaux, 5 cent. cubes. Les parasites parurent chez 12 vaches le 26 juin; chez 6, le 25. Les 26 et 27 juin l'injection fut faite de trypanobléu à 6, d'ichthargan à 18, d'arrhéнал à 17. La coloration de l'urine parut chez 11 de deux à trois heures et jusqu'à cinq jours après l'injection; elle se maintint de vingt-quatre heures à cinq jours sans susciter d'autres symptômes objectifs de maladie.

Au cours de l'immunisation au village de Pidma, 26 animaux parmi les non-vaccinés tombèrent malades. Depuis l'immunisation aucun animal n'est tombé malade parmi les vaccinés. Par contre, parmi les non-vaccinés, 15 animaux tombèrent malades en juin et juillet, en août, 3; au total 18.

Il s'ensuit que l'immunisation au village de Pidma a donné de bons résultats.

2° Villages de *Schang-Ostrow* et *Grand Peldogi*. Ces deux villages se trouvent aux bords du lac Pidmozéro. Ils possèdent : Ostrow, 100 animaux; Grand Peldogi, 60. L'épizootie piroplasmique débuta à Ostrow le 13 juin et au Grand Peldogi le 9 juin. Il y eut, avant le commencement de la vaccination, 25 animaux malades à Ostrow et 15 au Grand Peldogi.

Infecté à Ostrow, le 9 juillet, 40 animaux; au Grand Peldogi, le 5 juillet, 21 animaux, dont 3 exclus (période d'incubation). Virus : le mélange de 3 animaux malades d'origine locale : n° 50 de Wolostnoi Nawolok, infection des érythrocytes, 4,9 p. 100; n°s 51 et 52 d'Ostrow, infection 2,3 et 4,7 p. 100 et quatrième virus d'origine non locale; n° 33, Nowossélié, aux bords de la Swir, infection 0,9 p. 100. Pourcentage des érythrocytes parasités de ce mélange : 3,3 p. 100.

Grand Peldogi introduit un mélange de deux virus d'origine locale : n° 45, Wolostnoi Nawolok, infection 2,1 p. 100 et n° 47, Wélíkii Nawolok, 3,3 p. 100; pourcentage de l'infection du mélange : 7,2 p. 100. Quantité : 3 cent. cubes.

Les premiers parasites (formes annulaires) parurent dans les deux villages dans quatre jours. Ce même jour, injection de trypanobléu à tous les animaux. Température avant l'injection :

39° et davantage seulement chez 4 animaux; chez tous les autres, moins de 39°.

Les jours suivants, coloration de l'urine en rouge chez un seul animal du village d'Ostrow, disparue trois jours plus tard. Pendant l'immunisation, 5 animaux non vaccinés furent atteints de maladie naturelle, dont 2 à Ostrow et 3 au Grand Peldogi.

Après l'immunisation parmi le bétail non vacciné, 2 animaux tombèrent malades de piroplasmose à Ostrow et 3 au Grand Peldogi.

3° *Petit Peldogi*, tout petit village situé à 1 kilomètre de Grand Peldogi, possédant en tout 33 animaux. La piroplasmose s'y maintient depuis deux ans; au cours de l'année dernière (1925), il y eut seulement 2-3 cas de maladie; cette année-ci (1926) « l'irruption épizootique » commença le 9 juin. Lors des vaccinations à Grand Peldogi, on proposa aux habitants de Petit Peldogi d'y avoir également recours, mais ils refusèrent. Plus tard, vers le 20 juillet, quand 6 animaux tombèrent malades, ils se rendirent compte de leur faute et demandèrent la vaccination pour le restant de leur troupeau. De cette manière, la vaccination fut faite ici, comme ailleurs, au plus fort de l'épizootie.

24 juillet, infecté 21 animaux; 1 exclu (période d'incubation); virus d'origine locale d'une vache (n° 67) de Wolostnoï Nawolok. Infection des érythrocytes: 4,4 p. 100. Quantité: 3 cent. cubes. Nous avons appliqué ici le procédé simultané; le 25 juin, lendemain de l'infection, injecté de l'ichthargan à tous les animaux infectés.

La coloration de l'urine en rouge parut dans 14 cas après cinq à huit jours; disparut après un à trois jours; à l'exception d'un cas (forte constipation), les animaux furent légèrement malades.

Plus tard jusqu'en automne, on n'observa pas de malades parmi les animaux immunisés, tandis que 2 des 3 animaux non vaccinés de ce village tombèrent malades de piroplasmose.

3° *Village de Wolostnoï Nawolok* (aussi aux bords du lac Pidmozéro). L'épizootie éclata le 13 juin. Avant l'immunisation, 9 animaux furent atteints de piroplasmose. L'infection fut faite à 17 animaux le 1^{er} août. Virus, mélange de quatre virus d'ori-

TABLEAU VIII.

PROCÉDÉ d'immunisation	VILLAGES	TRYFANOBLEU	ICHTHARGAN	ARRHÉNAL
Classique de Theiler.	Pidma.	68	68	4
	Immunisés (total).			
	Urine rouge.	3 (4,4 p. 100)	12 (17,6 p. 100)	1 (25 p. 100)
	Grand Peldogi	20		
	Immunisés (total).			
	Urine rouge.	0		
	Schang-Ostrow	38		
	Immunisés (total).			
	Urine rouge.	0		
	Wolostnoi Nawolok.			17
Simultané.	Immunisés (total).			43 (76,4 p. 100), 2 morts.
	Urine rouge.			
	Total	426	68	21
	Immunisés (total).			
	Urine rouge.	3 (2,3 p. 100)	12 (17,6 p. 100)	14 (66,6 p. 100)
	Petit Peldogi		20	
	Immunisés (total).			
	Urine rouge.		14 (70 p. 100)	
	Total jusqu'à dix ans			185
	Dix ans et plus			50
				235

gine locale : Grand Nawolok, n° 72, infection 8,4 p. 100; Grand Peldogi, n° 73, infection 2,4 p. 100, et n° 74, infection 11,9 p. 100; Petit Peldogi, n° 76, infection 5,4 p. 100. Pourcentage des érythrocytes parasités du mélange : 5,4 p. 100. Quantité : 3 cent. cubes. Les premiers parasites parurent le 4 août. Les 5-6 août, injection sous-cutanée d'arrhéнал. Température normale, excepté dans 2 cas. Résultats peu réconfortants. Pendant un laps de temps de vingt-quatre à quatre-vingt-seize heures après l'injection de l'arrhéнал, la coloration de l'urine parut chez 13 animaux : chez 5 animaux en vingt-quatre heures, chez 6 en quarante-huit heures, chez 1 en soixante-douze heures, chez 1 en quatre-vingt-seize heures. 5 de ces 13 animaux furent gravement atteints (2 succombèrent, l'un âgé de douze, l'autre de quatorze ans), 2 de façon moyenne, 6 légèrement. En général, cette catégorie de vaches était à un âge défavorable, 7 ayant dix ans et plus, c'est-à-dire 41,1 p. 100, tandis que dans les autres villages il n'y avait que 25,7 p. 100 de cet âge.

Parmi les autres animaux, aucun ne tomba malade.

Tous les animaux que nous avons immunisés paissaient tout le temps dans des pâturages infectés de tiques et furent gardés à la maison seulement une fois, le jour de l'injection du produit. Il n'y eut de diminution de lait que dans très peu de cas. Des œdèmes furent observés chez quelques animaux seulement à l'endroit de l'injection (après la pénétration du produit sous la peau), mais ils furent de courte durée.

Le tableau VIII démontre les résultats de la theilérisation.

Comparons la piroplasmose parmi les animaux immunisés et non immunisés (tableau IX).

Tandis que, parmi les animaux non immunisés, 23,3 p. 100 tombèrent malades, nous voyons qu'aucun des animaux immunisés ne fut atteint de la maladie.

Ainsi nos essais en masse prouvèrent que le procédé d'immunisation d'après Theiler (théilérisation), qui donne de bons résultats vis-à-vis de la *Piroplasma bigeminum*, a donné de tout aussi bons résultats vis-à-vis de la *Babesiella bovis*.

C'est la première fois qu'on immunise vis-à-vis de ce parasite non seulement dans notre pays, mais en Europe en général.

CONCLUSION

En nous basant sur l'expérience relativement grande que nous avons obtenue dans les villages fortement infectés de piroplasmose au cours de l'année 1926, nous pouvons tirer les conclusions suivantes.

L'immunisation d'après le procédé classique de Theiler (infection par virus des animaux ayant la maladie naturelle avec injection subséquente intraveineuse de trypanoblen ou d'ichthargan) nous a donné de bons résultats. Les jours suivant immédiatement l'immunisation, l'urine était parfois colorée en rouge (dans 2,4 p. 100 des cas après le trypanoblen et dans 17,6 p. 100 après l'ichthargan); cependant les animaux avaient une forme légère de la maladie et la coloration de l'urine disparaissait quelques heures ou quelques jours après. Les animaux vaccinés ont été solidement immunisés, tandis que, parmi le bétail non vacciné, l'épizootie continuait à faire des ravages.

Nous n'avons pas abandonné l'idée d'une immunisation plus simple, au moyen d'une injection sous-cutanée d'arrhéнал, bien que ce moyen ait provoqué de graves maladies chez 70 p. 100 pendant les jours suivant l'immunisation, dont 10 p. 100 avec issue mortelle.

Le procédé simultané, bien que donnant de bons résultats, est cependant inférieur au procédé classique de Theiler, car 70 p. 100 des animaux immunisés ont eu la coloration de l'urine en rouge pendant les jours suivant l'immunisation. Il est vrai que ce symptôme disparaissait bientôt; néanmoins les maladies en masse font une impression désastreuse sur la psychologie des propriétaires des animaux.

L'année prochaine (1927) nous avons l'intention de faire ces vaccinations plus en grand et, en outre, de les faire avant d'envoyer le bétail au pâturage.

Quelles indications techniques pourrions-nous donner à ceux qui désireraient appliquer ce procédé?

Nous sommes arrivés aux conclusions suivantes: 1° Que 3 cent. cubes sont une dose suffisante de sang infecté défibriné

pour une infection sous-cutanée; 2° que le pourcentage des érythrocytes parasités ne doit pas être moins de 5 et ne doit pas dépasser 10; 3° que la période d'incubation dans ces conditions doit être de quatre jours.

Le virus doit être d'origine locale, sinon doit au moins provenir des points les plus rapprochés de ceux où l'on fait la vaccination.

Le moment le plus important après l'infection est celui de l'apparition des parasites dans le sang. En nous basant sur les études systématiques des frottis de 471 animaux infectés expérimentalement pour nos immunisations, nous nous sommes convaincus que la coloration de l'urine en rouge succède à l'apparition dans le sang des formes en poires; l'apparition des formes annulaires n'est pas accompagnée de coloration. Les anneaux sont les premières formes de piroplasmes dans le sang; elles sont suivies des formes amiboïdes (formes de division); quant aux formes en poires, elles sont le résultat de la division. Voici pourquoi il est urgent de ne pas laisser échapper le moment du passage des formes annulaires en formes en poires, ce qui fait éviter l'apparition de la coloration de l'urine.

Vu que les formes annulaires apparaissent ordinairement en trois à quatre jours, il faut absolument faire l'injection juste quatre jours après l'infection.

Quant aux produits thérapeutiques, le trypanoblu et l'ichthargan conviennent également, mais l'arrhéнал doit être appliqué exclusivement aux jeunes animaux.

On pourrait supposer que l'arrhéнал donne de mauvais résultats; mais, en revoyant cette partie de nos travaux, nous trouvons que les animaux âgés de moins de dix ans n'ont pas du tout de coloration de l'urine les jours suivant l'immunisation (4) ou n'ont qu'une maladie légère (4), ou moyenne (2). Les animaux âgés de plus de dix ans sont gravement malades (5, dont 2 avec issue mortelle) ou ont une maladie de moyenne gravité (2). Par conséquent tout tient ici à l'âge. Nous pouvons tirer la conclusion que, sans exclure l'arrhéнал des procédés d'immunisation, on doit l'administrer seulement aux animaux plus jeunes.

Nous avons trouvé que la température n'a aucune part dans le processus d'immunisation; elle ne s'élève pas avec l'appari-

tion des formes annulaires ; l'élévation indiquant toujours la présence dans le sang des formes en poires.

Nous avons fait l'immunisation pendant la période où les animaux allaient au pâturage. Après l'injection, il n'est pas nécessaire de tenir les animaux à l'étable ; on peut les envoyer aux champs. Le seul jour où nous les gardions à la maison était celui de l'infection ; le lendemain les animaux peuvent aller au pâturage.

**APPLICATION DES PROCÉDÉS
UTILISANT LES SÉRUMS ACTIFS
AU SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS,
DES MANIFESTATIONS GONOCOCCIQUES
ET DE LA TUBERCULOSE**

par HUGO HECHT, de Prague.

**I. — LES TECHNIQUES UTILISANT LES SÉRUMS ACTIFS
DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS.**

Lorsqu'on entreprend l'exposé des recherches ayant pour but l'utilisation des sérums non chauffés pour la réaction de Bordet-Wassermann, il faut se reporter surtout aux travaux des auteurs français qui ont le plus contribué à l'élaboration des bonnes techniques et à leur généralisation, à tel point que ces techniques occupent actuellement une place dominante parmi tous les autres procédés du séro-diagnostic de la syphilis.

Nous avons été le premier à recommander l'emploi des sérums actifs pour le séro-diagnostic de la syphilis, et nos plus anciennes publications à ce sujet remontent aux années 1908 et 1909.

Au début, nous avons utilisé pour chaque examen 4 tubes, dont le premier recevait 0 c. c. 1 de sérum et 1 cent. cube de sang de mouton à 2 p. 100 ; les deux tubes suivants recevaient chacun 0 c. c. 1 de sérum et une ou deux doses d'antigène, et le quatrième tube 0 c. c. 2 de sérum et une seule dose d'antigène.

En 1910, nous avons proposé l'emploi d'une dose de 0 c. c. 2 de sérum au lieu de 0 c. c. 1. Enfin, en 1922, nous avons décrit un procédé nouveau avec l'emploi de 4 tubes, dont les trois premiers servaient à la détermination de la force hémolytique du sérum à examiner : ce dernier titrage avait lieu en présence de 0 c. c. 2, 0 c. c. 4 et 0 c. c. 6 de sang de mouton à 5 p. 100 ;

de plus, depuis 1924, nous ajoutons à chacun de ces tubes une quantité d'alcool à 96° égale à celle contenue dans l'antigène; en même temps, nous avons limité la quantité de sérum à examiner à 0 c. c. 1, en vue d'économiser le sérum qu'on examinait en présence de deux antigènes, 8 tubes étant nécessaires pour chaque réaction.

En 1926, nous avons décrit notre dernière modification: nous avons notamment remplacé l'antigène alcoolique par l'antigène débarrassé de son alcool, certains tubes témoins devenaient ainsi superflus: la quantité de sérum à examiner fut maintenue à 0,1 mais 2 tubes sur 8, nécessaires à la réaction, recevaient, respectivement, 0 c. c. 15 et 0 c. c. 2 de sérum; 4 tubes étaient destinés à la détermination de l'index hémolytique qu'on effectuait en présence de doses croissantes d'hématies de mouton à 5 p. 100, allant de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 5.

Les procédés utilisant les sérums non inactivés furent l'objet de recherches des auteurs français, très peu de temps après nos premières publications. Ainsi, Hallion et Bauer, dès 1910, recommandent la détermination de l'index hémolytique pour chaque sérum à examiner, mais il est juste de constater que ce sont les travaux de Levaditi et Latapie qui ont le plus contribué au succès de cette technique et à sa vulgarisation rapide.

Levaditi et Latapie se servaient de 3 tubes pour chaque sérum à examiner, dont chacun recevait 0 c. c. 1 de sérum non chauffé; le premier tube recevait, en outre, 0 c. c. 1 et le deuxième 0 c. c. 2 d'antigène; on complétait avec l'eau physiologique jusqu'à 0 c. c. 4 de volume total; après un séjour d'une heure à 37°, on ajoutait 0 c. c. 1 d'émulsion globulaire à 5 p. 100, puis on remettait le tout pour trente minutes à l'étuve.

Weinberg recommandait l'emploi de 6 tubes, dont chacun recevait 0 c. c. 1 de sérum frais; on versait, en outre, 0 c. c. 1 d'antigène dans le premier et le quatrième tube, et 0 c. c. 2 d'antigène dans le deuxième et le cinquième tube; après avoir complété avec de l'eau physiologique pour obtenir 0 c. c. 4 de volume total, on mettait les tubes pour une heure à 37°, puis on versait 0 c. c. 1 d'émulsion globulaire dans chacun des trois premiers tubes et 0 c. c. 2 de la même émulsion dans les trois derniers tubes.

Le titrage exact de la force hémolytique du sérum, d'après Weinberg, doit être effectué de la manière suivante : on prend une série de 10 tubes à hémolyse, dont chacun reçoit 0 c. c. 1 de sérum à examiner et des doses croissantes de globules de mouton, en commençant par 0 c. c. 1 et en terminant par 1 cent. cube.

La technique de Rubinstein découle directement de celle de Weinberg : on prépare pour chaque réaction 6 tubes contenant chacun 0 c. c. 1 de sérum à examiner ; on verse dans chacun des 3 premiers tubes 0 c. c. 15 d'antigène et on ajoute à tous les tubes de l'eau physiologique jusqu'à 0 c. c. 4 de volume total ; après une heure de séjour à l'étuve, on verse 0 c. c. 1 d'émulsion globulaire dans le premier et le quatrième tube, 0 c. c. 2 dans le deuxième et le cinquième tube et 0 c. c. 3 dans le troisième et le sixième tube.

Mutermilch procède de la manière suivante : il prépare 6 tubes pour chaque réaction : les 3 premiers servent à la détermination de l'index hémolytique et les 3 derniers à la réaction principale ; la dose de sérum est de 0 c. c. 1, la dose d'antigène de 0 c. c. 1 et 0 c. c. 2 ; la force hémolytique du sérum est éprouvée en présence de trois doses d'émulsion globulaire à 5 p. 100 : 0 c. c. 3, 0 c. c. 6 et 0 c. c. 9 ; après une heure et demie de séjour à l'étuve, il ajoute aux trois tubes de la réaction principale un tiers ou la moitié de la quantité de sang hémolysé dans les trois autres tubes ; la lecture des résultats se fait après trente à quarante minutes d'un nouveau séjour à l'étuve. Cette technique fut utilisée par Mutermilch lors de la Conférence sérologique internationale convoquée à Copenhague en 1923 par les soins de l'organisation d'Hygiène de la Société des Nations, avec le plus vif succès.

Mentionnons encore les auteurs suivants qui ont étudié particulièrement les techniques utilisant les sérums actifs : Busila, dès 1910, recommandait la recherche de l'index hémolytique pour tout sérum à examiner, en ajoutant des doses croissantes d'une émulsion globulaire concentrée à une dose fixe de sérum. Gradwohl utilisait 10 tubes pour déterminer l'index hémolytique. Ronchèse se servait d'une dose fixe d'émulsion globulaire et variait les doses du sérum ; pour la réaction principale, il choisissait la dose de sérum capable de dissoudre en une

demi-heure la dose de sang de mouton. Une technique très simple pour la détermination de l'index hémolitique du sérum fut aussi décrite par Tribondeau.

Tout dernièrement, Bruck a proposé l'emploi des doses massives de sérum soumis à l'examen. Cet auteur utilise, pour chaque réaction, 5 tubes, dont les 4 premiers reçoivent 0 c. c. 5 et le cinquième 0 c. c. 25 de sérum humain; l'antigène est additionné en doses suivantes : 1 cent. cube au premier tube, 0 c. c. 5 au deuxième tube et 0 c. c. 3 au troisième tube; l'eau physiologique sert à compléter jusqu'à 1 c. c. 5 de volume total; après un séjour d'une heure à 37°, chacun des 5 tubes reçoit 1 cent. cube d'émulsion globulaire à 1 p. 100. Les résultats obtenus par Bruck et ses collaborateurs Behrmann et Rosenberg au moyen de cette technique se sont montrés satisfaisants à un tel point qu'à la fin de leur travail ils s'expriment comme suit : « Notre technique utilisant les sérums non chauffés rend les méthodes aux sérums chauffés superflues; elle dépasse ces dernières en sensibilité et en spécificité, réduisant au minimum le nombre de résultats erronés; elle peut être placée, à ce point de vue, au même rang que les réactions de floculation et les réactions d'opacification. »

Mentionnons encore la technique de Beretváš. Cet auteur considère la détermination de l'index hémolitique de tout sérum soumis à l'examen comme indispensable et particulièrement importante; la recherche de l'index hémolitique se poursuit de la manière suivante : on prépare 4 tubes dont chacun reçoit 0 c. c. 2 de sérum humain et 0 c. c. 8 d'eau physiologique; on place les tubes à l'étuve pour une demi-heure, on ajoute des quantités d'émulsion globulaire à 5 p. 100 variant de 0 c. c. 2 à 0 c. c. 5 et on observe en combien de temps se produit l'hémolyse dans les divers tubes; Beretváš classe les sérums humains en quatre groupes, selon la force hémolitique du sérum, et il ajoute à chacun des tubes de la réaction principale la moitié de la quantité de sang hémolysé. Cette réaction principale s'effectue de la manière suivante : on verse dans un tube 0 c. c. 2 de sérum, 0 c. c. 1 d'eau physiologique et 0 c. c. 5 d'antigène; l'autre tube qui sert de témoin reçoit 0 c. c. 2 de sérum et 0 c. c. 8 d'eau physiologique; après un séjour d'une demi-heure à 37°, on ajoute à chacun de ces deux tubes la

quantité de sang égale à la moitié de la dose hémolysée; la lecture des résultats a lieu au moment d'une hémolyse complète du tube témoin. Beretväs exprime également l'avis que les techniques utilisant les sérums frais peuvent remplacer avantageusement la méthode classique de Wassermann.

Le choix judicieux d'une dose convenable d'*antigène* joue un rôle non moins important que la détermination de la force hémolytique du sérum. Tout antigène, éprouvé pour la réaction classique de Wassermann, convient également aux réactions utilisant les sérums actifs. Nous nous servons depuis quelques années d'un antigène dépourvu d'alcool qu'on obtient de la façon suivante : la veille de l'expérience, on verse l'antigène dilué avec de l'eau physiologique dans une large capsule en verre ou en porcelaine qu'on abandonne pour la nuit; l'alcool ainsi s'évapore, et on obtient le lendemain, après une agitation vigoureuse, une émulsion trouble, libre d'alcool et apte à servir. Cette émulsion doit être soumise préalablement à un titrage d'après la technique très simple qui consiste en ce qui suit : on choisit deux sérums au moins, dont l'un doit provenir d'un sujet bien portant et l'autre d'un sujet malade, mais non syphilitique. On prépare pour chaque sérum une série de 10 tubes dont chacun reçoit 0 c. c. 1 de sérum; les quatre premiers tubes servent à la détermination de l'index hémolytique; les six derniers tubes reçoivent des doses croissantes d'antigène (1 cent. cube d'antigène pour 9 cent. cubes d'eau physiologique), en commençant par 0 c. c. 25 et en terminant par 1 cent. cube; après un séjour d'une heure à 37°, on ajoute à tous les tubes la dose titrée d'émulsion globulaire; après un nouveau séjour d'une heure à 37°, on note la dose la plus forte d'antigène n'empêchant pas l'hémolyse; la moitié de cette dernière devra être considérée comme titre pour l'antigène examiné. On éprouve ensuite cette dose d'antigène, au point de vue de spécificité et de sensibilité, en présence d'un nombre aussi considérable que possible de sérums syphilitiques et de sérums non syphilitiques. Le schéma de cette opération peut être présenté comme suit :

	TUBES				TUBE TÉMOIN	TUBES					
	1	2	3	4		5	6	7	8 éventuellement	9	10
Sérum	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,15	0,1	0,1	0,15	0,2
Eau physiologique	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1						
Antigène I (extrait de cœur de bœuf)						1,0	1,0	1,0			
Antigène II (extrait cholestériné)									1,0	1,0	1,0
Séjour à l'étuve	25 minutes.					1 heure.					
Sang de mouton à 8 p. 100.	0,1	0,2	0,3	0,5		La dose titrée de sang.					

L'emploi du tube témoin a son utilité, attendu que l'expérience peut être considérée comme terminée dès le moment où celui-ci est hémolysé, et on peut sans tarder enregistrer les résultats.

II. — LES TECHNIQUES UTILISANT LES SÉRUMS ACTIFS DANS LES AFFECTIONS GONOCOCCIQUES.

La réaction de fixation de l'alexine fut appliquée pour la première fois au diagnostic des affections gonococciques par Müller et Oppenheim en 1906, et, en même temps et indépendamment de ces derniers, par Brück; les techniques employées par ces auteurs étaient calquées sur celle de la réaction classique de Wassermann. Plus tard, un grand nombre d'expérimentateurs ont étudié cette réaction (A. Kohn, Bruhns, Demska, Hecht et Lederer (1), Lenartowicz, Sommer, Klöppel, Heuck et Lochbrunner, Baumann et Heimann, A. Kohn et Grafenberg, Stern et Fischer, Finkelstein et Gerschun, Maderna, Priestley, Teague et Torrey, Nicolle, Jouan et Debains).

Les méthodes utilisant les sérums non chauffés furent appliquées au diagnostic des infections gonococciques par Montpellier et Lacroix, Rubinstein, Savnik et Prochazka, plus tard par Brück.

(1) Ce travail, paru en 1912 dans le numéro 40 de la *Wiener Klin. Woch.*, n'est signé que par Lederer, mais il y est dit expressément que la technique fut élaborée par Hecht; cette technique utilisait le sérum humain inactivé à la dose de 0,2 et, comme antigène « Arthigon » de commerce, à la dose de 0,05-0,2.

Montpellier et Lacroix ont suivi la technique d'tchedoëm-, H fiée en France par Rubinstein. Ce dernier auteur a élaboré plus tard encore une technique nouvelle. Savnik et Prochazka, après avoir expérimenté les deux techniques, celle aux sérums inactivés et celle aux sérums actifs, concluent à la supériorité de la première de ces deux méthodes; toutefois, il y a lieu de remarquer que ces auteurs avaient commis l'erreur d'ajouter de l'alexine de cobaye et de l'hémolysine anti-mouton aux sérums humains non chauffés; leurs résultats ne peuvent donc pas être mis en ligne de compte lorsqu'on les compare à ceux obtenus par nous. Le même reproche peut être formulé vis-à-vis de Brünauer, Müller et Oppenheim, lesquels ajoutaient également de l'alexine de cobaye et de l'hémolysine de lapin aux sérums non inactivés.

La technique de Brück, Behrmann et Rosenberg ne diffère en rien de celle que ces auteurs avaient appliquée au séro-diagnostic de la syphilis, sauf en ce qui concerne l'antigène, lequel se compose d'une émulsion de plusieurs souches de gonocoque contenant un milliard de germes par centimètre cube.

Notre technique personnelle du séro-diagnostic des affections gonococciques ne diffère de celle que nous avons décrite pour le séro-diagnostic de la syphilis que dans l'emploi des doses plus fortes de sérum humain (0,2 au lieu de 0,1); cette précaution nous fut suggérée par le fait que le taux d'anticorps gonococciques dans les sérums des malades est parfois peu élevé. Tout comme dans la séro-réaction de la syphilis, il est indispensable de déterminer l'index hémolytique de chaque sérum soumis à l'examen; on prépare pour cette opération 4 à 6 tubes, dont chacun reçoit 0,2 de sérum humain et des doses croissantes d'émulsion globulaire (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, etc.); nous ajoutons aux tubes de la réaction principale la dose maxima de sang hémolysé.

N'importe quel vaccin gonococcique polyvalent renfermant au moins un milliard de germes par centimètre cube peut servir d'antigène; « Arthigon très fort » de commerce s'y prête très bien. Il y a lieu, toutefois, de remarquer que les vaccins fraîchement préparés se montrent supérieurs aux vaccins très âgés.

Le titrage de l'antigène gonococcique est indispensable. On

opère comme pour le titrage de l'antigène syphilitique, mais en présence de plusieurs sérums provenant des sujets atteints d'urétrite, de prostatite et d'épididymite gonococcique. La dose empêchante une fois obtenue, on éprouve encore la spécificité du même antigène vis-à-vis des sérums normaux et des sérums syphilitiques.

Nous recommandons d'examiner, en outre, chaque sérum en présence d'un bon antigène syphilitique; cette manière de procéder nous paraît d'autant plus nécessaire que Rubinstein avait constaté que 30 p. 100 de sérums syphilitiques fournissent une réaction positive en présence d'un antigène gonococcique, sans qu'il y ait une infection gonococcique.

On dispose l'expérience de telle manière qu'on détermine tout d'abord l'index hémolytique; ce résultat s'obtient en une heure; on profite de ce moment pour préparer les tubes avec l'eau, l'antigène et le sérum; on choisit, autant que possible, un sérum sûrement gonococcique et un sérum sûrement syphilitique, qu'on examine en même temps que le sérum inconnu. On procède à la lecture des résultats dès que le tube témoin de l'expérience principale est complètement hémolysé.

La réaction de fixation de l'alexine n'est pas appelée à jouer un rôle important dans le diagnostic d'une urétrite gonococcique, ce dernier pouvant toujours être effectué au moyen d'un simple examen microscopique du pus urétral. Par contre, elle peut rendre des services très appréciables dans le diagnostic des affections gonococciques des articulations, des testicules, de la prostate, de l'iris, du cœur, des annexes chez la femme, de l'endocardite et, en général, chaque fois que le problème d'un diagnostic différentiel se pose entre l'affection gonococcique d'un côté et la tuberculose, la syphilis, etc., d'un autre côté.

L'interprétation des résultats obtenus au moyen d'une gonoréaction doit se faire avec une prudence extrême, et toujours en liaison étroite avec l'observation clinique.

Voici quelle est notre opinion personnelle à ce sujet :

1° Un résultat négatif, obtenu aussi bien en présence d'un antigène gonococcique qu'en présence d'un antigène syphilitique, n'exclue pas le diagnostic d'une affection gonococcique, car certaines formes de cette affection, urétrite antérieure

simple, par exemple, s'accompagnent d'un taux d'anticorps sanguins trop faible pour être décelé par une réaction de fixation de l'alexine.

2° En présence d'une gono-réaction positive et d'une réaction de Bordet-Wassermann négative, on a le droit de conclure à une gonococcie.

3° En présence de deux réactions positives, le diagnostic d'une infection gonococcique devient probable, mais nullement certain.

4° Une gono-réaction positive, devenue négative après un traitement approprié, n'indique pas avec certitude l'extinction de l'infection gonococcique.

5° Il y a, en outre, lieu de remarquer que les malades atteints d'une affection non gonococcique, mais traités, pour une raison quelconque, par un vaccin gonococcique, peuvent développer dans leurs sérums des anticorps gonococciques.

Il résulte de l'exposé ci-dessus que la gono-réaction se comporte, au point de vue de l'importance diagnostique, à peu de chose près comme une réaction de Wassermann.

III. — TECHNIQUES UTILISANT LES SÉRUMS ACTIFS DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE.

Les premières tentatives, déjà anciennes, d'application de la fixation de l'alexine au diagnostic de la tuberculose furent peu heureuses; ces échecs s'expliquent par le choix de divers tuberculines comme antigène. Plus tard, on s'est adressé aux corps microbiens entiers et aux divers extraits de bacilles de Koch, et dès lors on a enregistré des résultats beaucoup plus encourageants. Parmi les antigènes les plus répandus, mentionnons les suivants :

Antigène de Calmette se composant d'un mélange des corps microbiens et de leurs extraits.

Antigène de Besredka, préparé avec des cultures de bacilles de Koch sur le milieu à œuf; la préparation de cet antigène est assez délicate, mais en cas de réussite il donne toute satisfaction.

L'extrait aqueux de bacilles de Koch, préparé par Blumenthal, présente l'inconvénient d'une conservation trop limitée.

Un excellent antigène fut aussi préparé par Boquet et Nègre, au moyen d'une extraction des bacilles de Koch par l'alcool méthylique après le traitement préalable avec l'acétone.

Les techniques du séro-diagnostic de la tuberculose sont aussi nombreuses que celles élaborées pour le diagnostic de la syphilis et de la gonococcie. Mentionnons les suivantes :

Procédé de Kabelik et Gellner, calqué sur celui de Hecht-Rubinstein, en présence de l'antigène de Boquet et Nègre.

Dans leur technique primitive, la réaction s'effectuait dans 6 tubes, dont les 3 premiers servaient à la détermination de l'index hémolytique, et les 3 derniers à la réaction principale ; la fixation de l'alexine avait lieu à l'étuve à 37°. Plus tard, les auteurs ont préféré de poursuivre la réaction à la glacière à la place de l'étuve, et utilisaient 9 tubes au lieu de 6 tubes ; ils procédaient donc de la manière suivante : chacun des 9 tubes recevait 0,4 de sérum à examiner à l'état actif ; on versait ensuite 0,4 d'eau physiologique dans la série des 3 premiers tubes, 0,4 d'une dilution au 1/40 d'antigène tuberculeux dans la série des 3 tubes suivants, et 0,4 d'antigène syphilitique dans la série des 3 derniers tubes. On plaçait les tubes pour dix-huit heures à la glacière (à 4°) et on ajoutait ensuite l'émulsion globulaire à 2 p. 100 en quantités suivantes : 0,2 aux tubes 1, 4 et 7, 0,5 aux tubes 2, 5 et 8 et 1,0 aux tubes 3, 6 et 9. La lecture des résultats s'effectuait après vingt minutes de séjour à l'étuve.

Procédé de Oppenheim et Bleivas, basé sur celui de Hecht-Weinberg, très répandu en Amérique.

Procédé de Goldenberg, basé également sur l'emploi des sérums non chauffés, mais en présence de l'antigène de Besredka.

Procédé de Valtis, disposé selon le modèle de Mutermilch pour le séro-diagnostic de la syphilis (2 séries de 3 tubes, dont la première sert à la détermination de l'index hémolytique et la dernière à la réaction principale).

Procédé personnel, analogue à celui décrit ci-dessus pour le séro-diagnostic de la syphilis ; nous nous servons couramment de l'antigène de Boquet et Nègre, que nous diluons au 1/20 avec l'eau physiologique, en versant l'antigène dans l'eau, goutte par goutte, et en agitant continuellement ; cette

solution-mère est ensuite diluée à parties égales avec l'eau physiologique. L'antigène ainsi dilué doit être soumis à un titrage selon le même procédé qu'un antigène syphilitique ou un antigène gonococcique.

Il ne faut jamais oublier de préparer aussi les tubes de contrôle avec l'eau physiologique et le sérum, auxquels on ajoute les globules de mouton en même temps qu'aux tubes de la réaction principale.

Tout ce que nous avons dit à propos de l'appréciation des résultats dans les affections gonococciques s'applique également à la tuberculose. Donc : 1° le diagnostic de la tuberculose deviendra très probable lorsqu'on obtiendra une réaction positive en présence de l'antigène tuberculeux, et une réaction négative en présence de l'antigène syphilitique : 2° lorsque les deux réactions fourniront un résultat positif, aucune conclusion ne sera possible en ce qui concerne l'infection tuberculeuse ; 3° lorsque les deux réactions fourniront un résultat négatif, il sera impossible de conclure à l'absence de toute lésion tuberculeuse.

La majorité des auteurs signalent la concordance entre les résultats de l'examen sérologique et ceux obtenus par l'observation clinique (Valtis, Gellner) ; mais il y a lieu de remarquer que les cas de tuberculose très avancée fournissent souvent une séro-réaction négative.

IV

Les procédés utilisant les sérums non chauffés peuvent remplacer la réaction classique de Bordet-Gengou, non seulement dans la syphilis, la gonococcie et la tuberculose, mais aussi dans toutes les autres maladies infectieuses bénéficiant d'une réaction de fixation de l'alexine (kystes hydatiques, sporotrichose, fièvre typhoïde, etc.).

Il y a toutefois lieu de remarquer qu'un certain nombre, d'ailleurs restreint, de sérums humains (2 à 4 p. 100) ne contient pas de quantités suffisantes de substances hémolytiques capables de dissoudre les globules rouges de mouton : tantôt, c'est l'alexine qui fait défaut ; tantôt, c'est la sensibilisatrice

anti-mouton ; tantôt, enfin, on a affaire avec l'absence de ces deux substances à la fois.

Enfin, les liquides céphalo-rachidiens ne contiennent, généralement, aucune substance hémolytique.

Nous avons attiré l'attention sur ce fait dès 1910 (*Wien. klin. Woch.*, t. XXII, n° 10, et *Zeitschrift für Immunitätsf.*, t. V, n° 5, 1910). Voici comment on peut y remédier :

1° On peut essayer, en cas d'un manque partiel de substances hémolytiques, d'augmenter la dose de sérum ou de diminuer la dose d'émulsion globulaire, ou ajouter 0 c. c. 05 ou 0 c. c. 1 d'un sérum humain normal ;

2° On peut ajouter du sérum de lapin anti-mouton aux sérums dépourvus de sensibilisatrice hémolytique normale (sérums des nourrissons) ;

3° On peut ajouter de l'alexine titrée de cobaye, lorsqu'il s'agit de sérums dépourvus de cette substance (sérums vieux, par exemple) ;

Enfin, 4° Un procédé très simple, recommandé par Mutermilch, consiste en l'addition, à tous les tubes de la réaction, d'un sérum humain titré.

BIBLIOGRAPHIE

- HECHT : *Wien. klin. Woch.*, n° 50, 1908 ; *Wien. klin. Woch.*, n° 10, 1909 ; *Zeit. f. Immunitätsforschung und experimentelle Therapie*, 5, fasc. 5, 1910 ; *Dermatol. Woch.*, n° 13, 1922 ; *Deut. med. Woch.*, n° 40, 1924 ; *Klin. Woch.*, n° 54, 1926.
- HALLION et BAUER : *C. R. Soc. biol.*, 69, n° 30, 1910.
- LEVADITI et LATAPLE : *Presse méd.*, 4 novembre 1911 et 16 avril 1914.
- WEINBERG : *Ces Annales*, 1912, p. 424.
- RUBINSTEIN : *C. R. Soc. biol.*, 20 janvier 1917 ; *Presse méd.*, n° 33, 1919 et n° 10, 1925.
- MUTERMILCH : *Ces Annales*, 38, 1924, p. 827.
- BUSILA : *C. R. Soc. biol.*, 69, n° 37, 1910.
- GRADWOHL : *Journ. Amer. med. Ass.*, 63, n° 3, 1914, p. 240 ; 68, n° 7, 1917, p. 514 ; *Amer. Journ. for Syphilis*, 1, fasc. 3, 1917.
- RONCHESI : *C. R. Soc. biol.*, 27 juillet, 12 octobre, 11 décembre 1918.
- TRIBONDEAU : *C. R. Soc. biol.*, 16 juin 1917.
- BRUCK : *Klin. Woch.*, n° 26, 1926.
- BERETVAS : *Rivista di patologia sperimentale*, 1, n° 23, 1921.
- BASSET-SMITH : *British med. Journ.*, 12 mars 1910.
- BAZZICALUPO : *Gazetta internazionale med. chirurg.*, n° 3, 1925.
- BERNARD et JOLTRAIN : *C. R. Soc. biol.*, 69, 1910, p. 241.

- BETTANCOURT : *C. R. Soc. biol.*, 12 juillet 1919.
- BLAIVAS : *Journ. lab. and clin. med.*, janvier 1920, p. 224-252.
- BRINDEAU : *Bull. de l'Acad. de méd.*, **81**, n° 12, 1923.
- BRUCKNER et GALASESCU : *C. R. Soc. biol.*, n° 21, 1901.
- DEMANCHE et MENARD : *C. R. Soc. biol.*, **68**, n° 14, 1910.
- ESCHBACH et DUHOT : *C. R. Soc. biol.*, 10 septembre 1919, p. 452.
- A. FALLER : *Lanc. Clinic.*, 14 novembre 1914, p. 536.
- FAMULENER (L. W.) et HEWITT (Julia A. W.) : *Proc. of the soc. st. exp. biol. and med.*, **19**, 1922, p. 362; *Journ. of infect. dis.*, **31**, n° 3, 1922, p. 285-290.
- FICHET : *C. R. Soc. biol.*, **86**, n° 15, 1922, p. 810; *Arch. de méd. et pharm. navales* **113**, n° 3, 1923.
- GÉRARD et MOISSONIER : *C. R. Soc. biol.*, **91**, n° 37, 1925, p. 1371-1373.
- GROSSO : *Pathologica*, **13**, n° 316, 1922, p. 46; **15**, n° 339, 1923; **17**, n° 392, 1925.
- GURD : *Journ. of infect. diseases*, **8**, 1910, p. 427.
- HOFFMANN (K. F.) : *Med. Klin.*, n° 33, 1910.
- HUGEL et RUTE : *Münch. med. Woch.*, n° 10, 1910, p. 79-80.
- INTYRE (Mc), WORTH et INTYRE (A. P. Mc) : *Journ. of labor. and clinic. med.*, **6**, n° 12, 1921; **6**, n° 5, 1921.
- KABELIK : *Ceska dermatologie*, **4**, fasc. 5, 1923, p. 121-131.
- KOENIG : *Wien. klin. Woch.*, n° 32, 1909; *Deut. med. Woch.*, n° 11, 1910.
- KÖLMEYER (A.) : *Med. record.*, 21 octobre 1916.
- LÉRREDDE : Paris, Maloine, 1913.
- LÉRREDDE et RUBINSTEIN : *Bull. de la Soc. de dermat.*, 6 février 1913.
- MONTVAL : *Inaug. Diss.*, n° 963, 1911, Toulouse.
- MUTERMILCH et LATAPIE : *C. R. Soc. biol.*, **86**, n° 14, 1922, p. 748.
- MÜLLER : *Münch. med. Woch.*, n° 23, 1913.
- PINÈS (Noé) : *Journ. méd. de Bruxelles*, n° 26, 1912.
- RADAELI : *Giornale ital. de malat. vener. e de la pelle*, **62**, fasc. 5, 1921 et **65**, fasc. 3, 1924.
- SABRAZÈS et ECKENSTEIN : *La Médecine moderne*, 26 février 1910.
- SCHULZ : *Dermatol. Zeit.*, n° 11, 1909, p. 733.
- SPREMOLA : *Rinascenza med.*, **1**, n° 22, 1924, p. 522-525.
- STANCULEANU et LIEBREICH : *Revista stiintzelor med.*, octobre 1909.
- VENULET : *Polska gazeta lekarska*, **2**, n° 20, 1903, p. 346.
- WOJCIECHOWSKI : *Polnische Zeit. f. Dermatol. und Syphilis*, n° 7-9, 1912.
- MONTPELLIER et LACROIX : *Ann. de malad. vénér.*, **16**, 1921, p. 725.
- RUBINSTEIN : *Bull. de la Soc. franç. de derm. et de syph.*, **32**, n° 8, 1925, p. 407.
- BRUCK, BEHRMANN et ROSENBERG : *Klin. Woch.*, n° 26, 1926.
- BEAUVY (A.) : *C. R. Soc. biol.*, **87**, n° 35, 1922, p. 1125-1126.
- GOLDBERG : *Journ. de méd. de Paris*, **41**, 1922, p. 371; *C. R. Soc. biol.*, **86**, 1922, p. 192.
- KABELIK et GELLNER : *Casopis lékařuv ceskych*, n° 23, 1924.
- GELLNER : *Seuchenbekämpfung*, fasc. 5, 1925 Edition M. Perles, Vienne); *Zentr. f. Bakt.*, **99**, n° 234, 1926.
- TOMCIK et VIGNATI : *Casopis lékařuv ceskych*, n° 40, 1925.
- VALTIS : *Ces Annales*, **39**, n° 4, 1925, p. 365-367.
- UPHAM et BLAIVAS : *New York Med. Journ. et Med. Record*, **117**, n° 1, 1923, p. 22.

LE PROBLÈME DES CANCERS (1)

par A. BORREL.

Jadis la lèpre, la morve, la tuberculose, l'actinomycose faisaient partie, chez les anatomo-pathologistes, du groupe des tumeurs et aujourd'hui comme jadis on invoque souvent pour expliquer les tumeurs cancéreuses les puissances mystérieuses de l'hérédité et les diathèses morbides. La lèpre, la tuberculose, etc. sont sorties du groupe obscur des tumeurs pour entrer dans le domaine bien défini des maladies infectieuses; il en sera de même pour les cancers.

Nous ne pouvons pas avoir la prétention de connaître déjà tous les modes de l'infection et toutes les modalités de la réaction de l'organisme vis-à-vis des infections.

Il est déjà de toute évidence que dans le groupe actuel des tumeurs il y a une infinité de formes différentes et que chaque type de cancer devra être étudié et résolu à part; nous avons affaire non pas à un problème du cancer, mais au « Problème des Cancers ».

De tout temps — heureusement — il y a eu non pas seulement des théoriciens mais aussi des hommes de laboratoire et des expérimentateurs et l'on a fait beaucoup d'expériences sur le cancer. Expériences négatives pendant longtemps.

Les expériences positives et vraiment intéressantes datent à peine de trente-cinq ans. Morau, le premier en 1894, a porté la question du cancer sur le terrain solide de l'expérimentation; il a démontré qu'il était possible chez la souris de transmettre par l'inoculation une tumeur de la mamelle et Morau a fait des inoculations positives en série. Ce travail remarquable de Morau, jeune préparateur à la Faculté de Médecine de Paris, était resté ignoré, comme beaucoup de bons travaux.

Les mêmes inoculations furent reprises et réussies en 1902-1903 dans une série de laboratoires. Jensen à Copenhague,

(1) Conférence à la Société de Médecine du Bas-Rhin, le 17 décembre 1927.

nous-même à Paris, Ehrlich, Bashford, etc. réalisèrent l'inoculation en série de plusieurs cancers de la souris : sarcome, adéno-carcinome, chondrome, etc., et on pouvait penser résolu le problème de l'inoculabilité.

On s'aperçut bien vite qu'il n'en était rien, l'inoculation réussie ne démontrait pas la nature virulente du processus cancéreux, il s'agit simplement d'une greffe.

Le fragment de tumeur qui est transplanté se développe sous la peau de la souris inoculée comme une métastase, les cellules inoculées continuent à se développer chez le nouvel animal qui sert simplement de milieu de culture ; il n'y a pas de véritable infection.

La tumeur présentée ici n'appartient pas à la souris qui la porte ; elle est constituée par des cellules qui sont des descendantes directes des cellules cancéreuses d'une souris qui vivait en 1903. — Les cellules cancéreuses de cette tumeur appartiennent à la souris de 1903.

L'inoculation expérimentale par greffe a simplement démontré la pérennité de la cellule cancéreuse, capable de donner des métastases et de se multiplier indéfiniment dans le temps et dans l'espace. La masse de cancer que l'on peut obtenir en partant de quelques cellules cancéreuses initiales n'a pas de limite.

Ces constatations ont donc semblé donner raison aux partisans des théories purement cellulaires et diathésiques du cancer ; elles ont de beaucoup reculé la solution.

La nature infectieuse du cancer restait à démontrer. Nous allons voir cependant que, grâce à l'étude possible du cancer chez les animaux de laboratoire, la solution semble proche.

Chez l'homme et avec des tumeurs que l'on ne peut étudier que trop tardivement, les difficultés de l'étude étiologique sont insurmontables. Chez la souris ou chez le rat la question est plus abordable ; et depuis plus de vingt ans nous avons entrepris l'étude du problème du cancer spontané chez la souris et chez le rat.

Ces animaux sont très souvent cancéreux — on peut faire des élevages considérables — nous avons actuellement près de 6.000 souris en observation. Les générations se succèdent rapidement. Il y a facilement trois générations de souris en

une seule année; par conséquent le problème de l'hérédité est beaucoup plus facile que chez l'homme où trois générations demandent un siècle d'observation.

Mais surtout on peut avec la souris ou le rat avoir facilement des cancers à l'état naissant et par conséquent saisir le premier stade de la transformation d'une cellule ou d'un tissu normal en tissu cancéreux. L'étude du cancer spontané chez les animaux a donné des résultats qui ne sont pas négligeables puisque actuellement le rôle de certains parasites dans la genèse de certains cancers est hors de doute.

Déjà en 1906 il a été communiqué à l'Académie de Médecine une série d'observations faites chez le rat qui est souvent atteint d'une tumeur cancéreuse du foie, et nous avons affirmé que la tumeur du foie était due à l'ingestion des œufs du *Tænia crassicola* du chat.

Le sarcome développé dans le foie présente toujours en son centre un cysticerque : c'est le cysticerque qui provoque la formation de la tumeur. La tumeur sarcomateuse est bien un cancer, puisqu'elle est inoculable en série par greffe.

Ce fait important a été confirmé de tous les côtés et deux observateurs américains, MM. Bulloch et Curtis, ont obtenu expérimentalement sur 1.100 rats infestés avec des œufs de *Tænia crassicola* 85 cas de sarcome du foie avec présence du cysticerque au centre de la tumeur.

Il ne saurait être question d'hérédité dans la genèse de ce cancer; nous sommes bien en présence d'un cancer d'origine externe et infectieuse.

Le cysticerque seul est-il capable de provoquer la tumeur? Ou bien apporte-t-il un virus spécial qui provoquerait la multiplication cellulaire? Nous penchons pour cette deuxième hypothèse, basée sur la constatation que très souvent chez le rat il y a des cysticerques qui ne provoquent pas de tumeur.

Une autre observation importante a été faite, aussi en 1906, pour les cancers de la mamelle chez la souris. Les souris sont très fréquemment atteintes d'adéno-carcinome, tumeur réellement cancéreuse, puisque inoculable en série par greffe. Il est assez facile de trouver des cas de cancer tout à fait au début de leur développement, n'ayant même pas 1 millimètre.

L'étude sur coupes de ces cancers de la mamelle à l'état

naissant montre très souvent la présence d'un Nématode, une filaire microscopique. Le premier cas a été signalé en 1906 (même communication à l'Académie de Médecine); ici, à Strasbourg, où la question a été reprise grâce à l'élevage important qui a été constitué, nous avons déjà pu constater sept fois la présence de la filaire dans des cancers microscopiques, soit dans le cancer lui-même, soit au voisinage immédiat.

Les souris sont fréquemment infestées par cette filaire à laquelle M. Sambon a donné le nom de *Muspicea borreli*; il est facile de la trouver en préparant d'une façon spéciale la peau de la souris en vue de l'examen microscopique *in toto*; il sera important d'élucider le mode d'infestation spontanée par la filaire.

En 1912, Fibieger a démontré le rôle d'un ver dans l'étiologie d'un cancer de l'estomac chez le rat et a prouvé que l'infestation du rat se faisait par l'intermédiaire d'une blatte (*Periplaneta americana*) dont les rats sont très friands.

Dans toutes ces constatations qui sont du domaine expérimental, il ne saurait être question d'hérédité de cancer.

On a étudié chez l'homme les cancers de la face, surtout les cancers du nez qui sont des cancers à point de départ pileux (cancer *folliculorum*) et l'étude de cancers microscopiques (1 ou 2 millimètres de diamètre) a presque toujours montré au niveau de la tumeur, dans le follicule pileux en voie de transformation ou dans les glandes sébacées correspondantes, la présence d'une quantité anormale de parasites (*Demodex folliculorum*); il est infiniment probable que l'irritation par les colonies du *Demodex* prépare le terrain à une infection cancéreuse.

L'étude du cancer chez le cheval — examen et autopsie de 40.000 chevaux à l'abattoir de Brancion — est aussi en faveur du rôle de parasites vermineux dans l'étiologie de beaucoup de tumeurs du testicule ou du rein, organes très fréquemment infectés par des spiroptères. Les chevaux présentent ainsi très souvent des cancers de l'estomac ou de l'intestin, ils ont en nombre énorme des parasites vermineux de toute espèce dans le tube digestif; la proportion du cancer chez le cheval atteint 1 p. 100.

Si l'on songe à la proportion énorme des cancers du tube digestif chez l'homme — 65 p. 100 de la mortalité cancéreuse

— il semble bien qu'une bonne hygiène devrait veiller à une alimentation humaine plus rationnelle et plus propre.

Le danger des fumiers et l'infestation de notre tube digestif par les légumes mangés crus ne doit pas être négligeable au point de vue du cancer; les Pouvoirs publics, qui se sont toujours préoccupés de fournir une eau saine et potable, ont oublié l'alimentation solide souillée par la culture maraîchère.

Il est donc démontré que des parasites peuvent être la cause étiologique de certaines tumeurs cancéreuses; il reste à établir à notre avis le rôle possible d'un virus convoyé par l'helminthe ou l'acarien, virus qui, dans notre hypothèse, donnerait à la cellule normale le caractère d'une cellule cancéreuse, capable de se développer indéfiniment.

Mais les parasites ne peuvent pas être considérés comme la seule cause possible des cancers; la clinique nous montre avec grande évidence la fréquence de cancers développés sur des naevi, sur le *Xeroderma pigmentosum*, sur les brûlures, sur des lésions syphilitiques, sur les ulcérations par rayons X, sur corps étrangers, etc.

Il est remarquable de voir que toutes ces lésions pré-cancéreuses intéressent tout particulièrement le système pigmentaire ou plus exactement un système cellulaire auquel nous avons donné le nom de système neuro-tropho-pigmentaire à la suite d'une étude faite chez différents types zoologiques. (Le tissu réticulo-endothélial des auteurs allemands rentre pour une part dans le système.)

L'étude de ce grand système cellulaire nous paraît intimement liée à la question du cancer, et les parasites que nous avons étudiés ci-dessus — la filaire chez la souris — vivent et se développent précisément dans le plan trophique qu'il est très facile de mettre en évidence dans la peau de la souris.

Il y a aussi un âge du cancer et les statistiques montrent que cet âge correspond au moment du blanchiment des cheveux, au moment où il se passe dans l'organisme une sorte de crise correspondant précisément à l'époque où le système trophique que nous envisageons ici devient un système phagocytaire et provoque les scléroses et les dégénérescences qui caractérisent la vieillesse. Metchnikoff avait entrevu toute l'importance de cette crise, dont la cause nous échappe : on

pourrait presque comparer ces phénomènes de sénescence à une esquisse de mue avortée.

La pigmentation et la fonction pigmentaire n'est qu'un cas particulier du trophisme général, et si les cellules pigmentaires dans l'épiderme, dans la plume ou dans le poil inondent pendant toute la jeunesse les cellules épidermiques et le poil et la plume de granulations pigmentaires, il existe dans le même plan et dans la même situation des cellules trophiques sous-épidermiques ou intra-glandulaires; cellules interstitielles de la mamelle, cellules de Boll des glandes sudoripares, cellules de Kupfer, cellules interstitielles du testicule ou de l'ovaire, cellules folliculaires, névroglie, etc. qui ont précisément pour fonction de nourrir les épithéliums et de régler les sécrétions. Ces cellules trophiques, *alias* phagocytaires, *alias* cellules du tissu réticulo-endothélial, sont capables d'assimiler les éléments solubles du sang ou de la lymphe, capables de concréter ces éléments sous la forme de plastes figurés spécifiques et de transmettre ensuite ces éléments spécifiés aux cellules épithéliales ou aux cellules nerveuses ou aux cellules glandulaires. Mon élève et ami Masson les a très heureusement appelées cellules amboceptrices.

L'étude qui en a été faite dans toute la série animale, chez les mammifères (souris), chez les oiseaux (jeunes poussins), chez *Alytes obstetricans*, depuis le têtard dans l'œuf jusqu'au têtard adulte, chez les céphalopodes, chez les vers et en particulier chez les sangsues (*Hirudo medicinalis*, *Hemopsis sanguisuga*, *Glossosiphonia*, *Helobdella*, *Pontobdella*, *Piscicola*), montre avec la plus grande évidence la réalité d'un système trophique général dont la pigmentation n'est qu'un cas particulier et la réalité d'une vraie circulation trophique et pigmentaire, de cellule à cellule, aboutissant à l'excrétion pigmentaire et à l'élimination finale par la peau d'une série de résidus de l'alimentation cellulaire.

Chez les vers surtout cette notion de circulation peut être démontrée avec la plus grande évidence (*Hemopsis*, *Helobdella*, *Pontobdella*).

Le développement de ces recherches nous entraînerait trop loin et ne saurait trouver place ici; qu'il me suffise au point de vue de cancer de constater que les nævi sont souvent le

point de départ de cancer; que la cellule nœvique n'est nullement d'origine malpighienne; qu'il existe des nœvi et des cancers blancs aussi bien que des nœvi et des cancers pigmentés; que certains nœvocarcinomes sont du type nerveux; que très souvent, et le fait est évident dans beaucoup de cas de cancers du sein, la cellule cancéreuse provient de la couche externe de l'épithélium des conduits galactophores ou des cellules interstitielles des acini; que, en dernière analyse, on peut dire que la très grande majorité des carcinomes ont pour point de départ la cellule trophique et non la cellule épithéliale (mamelle, testicule, ovaire, etc.).

Parasites, brûlures, ulcérations, lésions syphilitiques, rayons X, goudron, toutes les causes précancéreuses ont une action élective et irritative évidente sur le système tropho-pigmentaire et préparent le terrain au cancer; la vieillesse et le fait qu'à ce moment le système trophique entre dans une période d'activité phagocytaire surexcitée est aussi un facteur précancéreux.

Mais aucune de ces causes précancéreuses n'explique seule à notre avis la transformation cancéreuse des cellules normales.

L'hypothèse d'un virus ou de virus cancéreux capables d'infecter ces cellules trophiques ou pigmentaires nous paraît indispensable pour expliquer les qualités si particulières de la cellule cancéreuse, et cette hypothèse que nous avons émise, il y a bien longtemps, nous paraît la plus sage et la plus logique actuellement.

Les cellules trophiques seraient les cellules réceptrices pour le virus cancéreux symbiotique.

Les exemples de symbiose que l'on peut citer déjà sont tout à fait suggestifs et tout le monde connaît dans les tumeurs des nodosités des Légumineuses la symbiose de la bactéroïde et de la cellule végétale; les cellules de la tumeur sont bourrées de milliards de microbes visibles et cultivables.

Noël Bernard a justement insisté sur le rôle des mycorrhizes chez les orchidées et chez les plantes en général et sur la symbiose qui commande la pérennité des végétaux.

Intéressantes aussi les tumeurs du *molluscum contagiosum* ou de l'épithélioma contagieux des oiseaux; nous avons déjà, en 1904, démontré la présence de granulations infiniment

petites et colorables seulement par la surcoloration, dans les cellules spécifiques, du *molluscum*; la symbiose est ici encore de toute évidence, bien que le microbe ou virus soit très petit et filtrant.

Il reste à démontrer un virus analogue, symbiotique, dans les cellules cancéreuses et c'est là le problème de l'avenir.

Un fait capital domine actuellement la question du virus cancéreux. Peyton Rous a découvert et démontré, dans un sarcome de la poule, la présence d'un virus filtrant.

Il s'agit d'une tumeur cancéreuse typique; on peut reproduire cette tumeur par l'inoculation d'un liquide débarrassé de toute cellule vivante par filtration sur bougie. Voici donc un cancer et un virus qui font le pont entre les Epithélioses que nous avons caractérisées jadis et les tumeurs cancéreuses proprement dites.

Comme le virus vaccinal, comme le virus de la clavelée, comme le virus du *molluscum*, comme le virus de la péri-pneumonie, le virus du sarcome de Rous est filtrant, il reste vivant après dessiccation, il est conservé par la glycérine. Pourquoi ne pas admettre qu'il s'agit d'un être vivant jusqu'ici ultra-microscopique et invisible? On a déjà vu le virus de la péri-pneumonie, on a déjà vu le virus du *molluscum*, on a déjà vu le virus vaccinal, il sera peut-être possible avec une méthode appropriée de voir le virus du sarcome de Rous et peut-être aussi plus tard d'autres virus cancéreux. La seule méthode qui a permis de voir avec évidence les microbes que l'on avait jusque-là appelés des microbes invisibles est la méthode de la surcoloration [mordantage à l'encre de Loeffler (tannate de fer) et couleurs basiques].

C'est la méthode employée pour la coloration des cils des bactéries; elle est assez délicate à mettre en œuvre et donne facilement entre des mains non habituées à cette technique des voiles et des précipités, mais on peut arriver à des résultats excellents et à de fort belles et très démonstratives préparations.

Pour la première fois, en 1904, la surcoloration a été appliquée à l'étude du *molluscum contagiosum* (*Soc. de Biologie*, 1904); il suffit de faire un frottis des cellules de la tumeur, et comme le nombre des granulations est immense, comme

il n'y a pas de sérosité, la technique est tout à fait simple.

Le microbe de la péripneumonie est obtenu facilement en culture; on a de belles préparations, en centrifugeant une culture en bouillon et en lavant le culot microbien à plusieurs reprises, pour débarrasser les microbes des impuretés du bouillon; les microbes sont étalés, fixés, mordancés et colorés et donnent des préparations très belles.

Dans les sérosités et les humeurs, ou dans les tissus, la surcoloration est plus difficile.

Pour la vaccine, la difficulté a été résolue de la façon suivante: l'œil du lapin est inoculé par de nombreuses petites scarifications, la lésion commence dès les premières vingt-quatre heures et en quarante-huit heures les pustules microscopiques sont déjà constituées.

L'œil inoculé est extirpé après anesthésie et conservé en atmosphère humide dans une boîte Pétri pendant quelques heures. Après quatre heures d'étuve, en appliquant sur l'œil une lame tiédie, on constate que toute une couche continue de l'épithélium cornéen reste adhérente à la lame en couche mince comme par une véritable décalcomanie. Il y a probablement une sorte de protéolyse des ciments intercellulaires qui permet ce résultat.

On peut successivement sur le même œil faire une, deux, trois, quatre et dix applications de lame, la couche adhérente va en diminuant de plus en plus, par épuisement des couches de l'épithélium, et on constate ainsi que la sérosité intercellulaire disparaît presque complètement. Les premières lames donnent de très belles préparations par le Giemsa, mais ne sauraient servir à la surcoloration; les dernières, au contraire, par la surcoloration permettent de voir une multitude de grains qui sont invisibles par toute autre coloration et que nous avons considérées comme pouvant représenter l'agent virulent; l'aspect des éléments est identique à celui des éléments du *molluscum*.

Dans le même ordre d'idées a été abordé le problème de la cytologie du cancer et la technique ci-dessous nous a donné le résultat cherché: des *cellules cancéreuses en couche uniforme, débarrassées de toute sérosité, pures sur la lame de verre*.

Nous avons cherché à obtenir avec les cellules en culture le phénomène qui se passe lorsqu'une colonie microbienne pous-

sant en gélose dans une boîte Pétri arrive au contact du verre et s'étale en couche d'une minceur extrême.

La technique employée est calquée sur la technique bactériologique, elle est d'une simplicité extrême et les résultats obtenus depuis plus de deux ans nous incitent à la communiquer.

1° Le flacon qui sert à la culture présente une ouverture à bords rodés, sur lesquels on peut appliquer une rondelle de verre amovible (coller à l'albumine, stériliser au four à flamber, obturer avec paraffine dure ou cire); il y a différents modèles, de 4 centimètres de diamètre, de 8 centimètres de diamètre, de 12 centimètres de diamètre, qu'on peut se procurer à la maison Leune.

2° Le tissu à cultiver, normal ou -cancéreux, est coupé très finement (fragments de 1 ou 2 millimètres), lavé à plusieurs reprises avec du tyrode et décanté dans un tube à essai de façon à avoir une très grande quantité de fragments dans un liquide transparent.

3° Le suc embryonnaire est préparé en broyant des embryons jeunes (sept à huit jours pour le poulet), dans un gros tube de verre à parois résistantes contenant de grosses perles de verre. Il suffit d'agiter fortement pour obtenir le broyage en quelques instants; on ajoute ensuite du tyrode (20 cent. cubes pour 1 gramme d'embryon), on émulsionne pendant une demi-heure et on centrifuge pour débarrasser des cellules de l'embryon le liquide clair qui surnage. *Ce temps est particulièrement important: malgré la dilution et la centrifugation, une demi-heure à 6.000 tours, il y a quelquefois des réensemencements possibles par les cellules du suc embryonnaire.* Il vaut mieux, dans certaines expériences de durée, filtrer le suc embryonnaire dilué, sur une bougie très poreuse, et en utiliser une plus forte proportion.

Les fragments à cultiver après décantation du liquide de lavage (tyrode) sont mis en suspension dans le suc embryonnaire.

Le plasma est obtenu par les méthodes connues; le plasma de poule, facile à obtenir, peut être utilisé dans presque tous les cas.

Pour l'ensemencement, on introduit avec une pipette dans le flacon de culture une plus ou moins grande quantité de suc

embryonnaire contenant les fragments du tissu à ensemercer ; chaque centimètre cube peut représenter un très grand nombre de fragments (20 à 30) ; suivant la dimension du flacon de culture, on utilise 1 ou 2 ou 4 cent. cubes de suc embryonnaire avec les fragments en suspension.

On ajoute le plasma nécessaire pour coagulation, V gouttes, X gouttes, 1 cent. cube ou 2 cent. cubes pour les boîtes de 12 centimètres de diamètre.

Pendant le temps de coagulation, les fragments laissés au repos prennent le contact du verre.

Après coagulation et obturation du flacon, on porte à l'étuve, et souvent la culture commence dès la cinquième ou sixième heure.

Après vingt-quatre heures, on peut introduire dans le flacon du suc embryonnaire dilué dans du tyrode, de façon à éviter une adhérence trop intime du plasma coagulé à la paroi du flacon.

La culture dans ces conditions se fait presque toujours avec une grande vigueur, d'abord dans le plasma où se produisent autour du fragment les irradiations cellulaires caractéristiques ; chaque petit fragment devient centre de culture ; si les fragments sont nombreux on peut avoir une confluence complète.

Comme cela a été signalé par Lévis, si les fragments sont petits, il n'y a pas de zone asphyxique.

La mince couche de plasma n'empêche nullement la culture abondante sur la paroi de verre.

La culture peut être prolongée pendant des temps variables de vingt-quatre heures à quinze jours, si on renouvelle convenablement le liquide du flacon.

La partie de la culture qui se trouve imbriquée dans le plasma peut être utilisée pour l'étude histologique, et donne l'aspect ordinaire des cellules, tandis que la pellicule mince de la culture étalée sur verre donne de magnifiques préparations cytologiques.

Pour faire la préparation il s'agit de se débarrasser du plasma et des fragments inclus dans le plasma de façon à n'avoir à fixer et à colorer que le plan unique de la culture des cellules collées à la paroi du verre. L'adhérence est tout à fait remarquable ; elle permet toutes les manipulations de fixation, de

lavage, de coloration, de mordantage, de déshydratation et d'éclaircissement dans le flacon même jusqu'à l'huile de cèdre : les rapports des cellules restent ce qu'ils étaient en culture.

Etant donné qu'on a évité pendant le séjour à l'étuve toute dessiccation des bords du coagulum dans le flacon, il suffit le plus souvent de décoller par un mouvement brusque le plasma qui se détache *in toto* ; on peut laver au tyrode après expulsion du plasma et fixer immédiatement : les cellules et les plages cellulaires sont débarrassées de toute sérosité et de toute trace de plasma.

Toutes les méthodes cytologiques ou bactériologiques, même les mordantages, sont applicables ; la préparation reste d'une pureté remarquable.

Cette technique très simplifiée peut être facilement mise en œuvre avec les précautions ordinaires qui sont prises pour des ensemencements bactériologiques.

Je l'ai surtout utilisée pour l'étude du sarcome de Rous et des tumeurs cancéreuses en général, mais elle donne de magnifiques préparations des tissus embryonnaires où les structures mitochondriales les plus délicates sont d'une évidence très grande comme le montrent les photographies.

Les fragments de cœur ont pu être observés avec leurs contractions pendant plus d'une semaine, de même des fragments d'intestin grêle d'embryon de bœuf restent vivants avec leurs mouvements péristaltiques pendant longtemps, et ces fragments d'intestin avec les bourrelets qu'ils développent pendant la contraction ressemblent à de petites hydres contractiles.

Les filets nerveux avec leurs expansions terminales les plus fines et leurs rapports avec les fibroblastes sont à observer excellemment ; étant donné que les rapports du vivant sont conservés, cette méthode de culture nous paraît devoir rendre de grands services en histologie ; on peut dans un même flacon observer des quantités de fragments et les expansions en forme de membranes cellulaires d'une minceur extrême.

La culture peut être continuée longtemps en remplaçant le plasma, soit par du jus embryonnaire bien débarrassé de cellules vivantes nouvelles, ou encore mieux en remplaçant le plasma initial par une nouvelle couche de plasma et suc embryonnaire.

Dans plusieurs expériences déjà faites, des cultures secondes ont été obtenues en récoltant les fragments ayant déjà donné une pellicule sur verre et en les transportant avec du plasma neuf dans un nouveau flacon.

Mais le but principal envisagé a été l'étude cytologique et bactériologique de la cellule cancéreuse et surtout l'application possible au tissu cancéreux des méthodes de mordantage qui ont déjà fait leurs preuves pour la recherche des microbes invisibles.

Nous avons eu facilement des cultures adhérentes au verre et utilisables de plusieurs cancers.

Sarcome de Rous,

Sarcome du rat de Jensen,

Sarcome 37 de la souris,

5 adéno-carcinomes de la souris,

1 métastase pleurale d'un cancer de l'ovaire chez la femme.

Toutes ces tumeurs donnent des aspects microscopiques caractéristiques pour chaque type de tumeur et faciles à reconnaître; particulièrement intéressants sont les différents types d'adéno-carcinomes spontanés que nous avons cultivés, les cellules qui sur coupes sont généralement en acini tubulaires s'étalent magnifiquement en lames minces et continues. Il est presque toujours possible de constater, en même temps que le développement de la cellule épithéliale, le développement des cellules de type fibroblastique et trophique, et nous nous demandons si la cellule épithéliale seule serait capable d'un développement notable sans la présence de cellules du type trophique.

Une fois, la culture d'un adéno-carcinome qui paraissait très homogène sur coupe nous a donné une culture mixte d'épithélio-sarcome.

L'avantage de la méthode employée est d'avoir sur lame de verre des cellules largement étalées, en couche extraordinairement mince, facile à fixer instantanément et permettant le mordantage. Les structures cellulaires, les réseaux mitochondriaux sont admirables et d'une extraordinaire richesse.

Le sarcome de Rous, le sarcome de Jensen nous ont montré des granulations fort intéressantes qui paraissent avoir leur point de départ de multiplication dans la formation archoplas-

mique para-nucléaire, indépendantes des bâtonnets et granules mitochondriaux.

Entre les cellules, surtout dans le sarcome de Rous, on voit quelquefois des aspects de grains dont le groupement rappelle l'aspect des grains de *molluscum*.

Une conclusion définitive serait prématurée, il faut de nouvelles recherches.

La description détaillée des aspects jusqu'ici observés fera l'objet d'une prochaine communication, mais on peut dire déjà qu'avant d'admettre les théories décevantes de l'hérédité du cancer, de la diathèse cancéreuse, d'un mouvement communiqué anarchique ou bactériologique, il y a encore beaucoup à faire dans la voie tracée et simple de l'hypothèse microbienne.

TRAVAUX DE A. BORREL SUR LE CANCER ET LES QUESTIONS CONNEXES

Travaux sur la lèpre.

BOINET et BORREL : Existence et interprétation des cellules géantes dans la lèpre. (*Société de Biologie*, 18 janvier 1890; *Revue de Médecine*, 1890.)

BORREL : Acariens et lèpre. (*Ces Annales*, 23, 1900, p. 125.)

Travaux sur le cancer.

BORREL : Note sur la division multipolaire du noyau. (*Société de Biologie*, 11 janvier 1890.)

BORREL : Division du noyau et division cellulaire dans les tumeurs. (*Société de Biologie*, 30 mai 1891.)

BORREL : Division du noyau et division cellulaire dans le cancer. (*Journal de l'Anatomie et de la Physiologie*, janvier 1892.)

BORREL : Formation cellulaire intranucléaire pouvant éveiller à tort l'idée de parasites. (*Société de Biologie*, janvier 1892.)

BORREL : Sur la signification des figures décrites comme coccidies dans les épithéliomas. (*Société de Biologie*, 12 juillet 1896.)

BORREL : Pseudo-coccidies dans l'épithélioma. (*Archives de Médecine expérimentale*, novembre 1890.)

BORREL : Evolution cellulaire et parasitisme dans l'épithélioma. (*Thèse de doctorat*, mai 1892.)

BORREL : Sur une évolution spéciale de la sphère attractive dans les cellules cancéreuses. (*Société de Biologie*, 31 mars 1900.)

BORREL : Les théories parasitaires du cancer. (*Rapport au Congrès de Paris*, 1900.)

BORREL : Les théories parasitaires du cancer. (*Ces Annales*, février 1901, 3 planches.)

- BORREL : Epithélioses et épithélioma contagieux. (*Ces Annales*, février 1903.)
- BORREL : Sur les inclusions de l'épithélioma contagieux. (*Société de Biologie*, décembre 1904.)
- BORREL : Infection vermineuse et spirochètes chez les souris cancéreuses. (*Société de Biologie*, 6 mai 1905.)
- BORREL : Les tumeurs de la souris. (*Société de Biologie*, 7 janvier 1905.)
- BORREL et HALLAND : Les tumeurs de la souris. (*Ces Annales*, mai 1905.)
- BORREL : Acariens et lympho-sarcome chez le chien. (*Académie des Sciences*, 11 février 1907.)
- BORREL : Helminthes et tumeurs. (*Académie de Médecine*, juillet 1906.)
- BORREL : Le problème du cancer. Etat actuel de la question du cancer, 75 pages avec figures. (*Bulletin de l'Institut Pasteur*, 5, 1907.)
- BORREL : Le problème étiologique du cancer. Conférence faite au Comité International du Cancer tenu à Berlin le 28 mai 1908. (*Ces Annales*, 22, 1908, p. 509.)
- BORREL, GASTINEL et CORESCU : Acariens et cancer. (*Ces Annales*, 23, 1909, p. 125.)
- BORREL : Parasitisme et cancer. Rapport fait au Congrès International de Pathologie comparée, 1910. (*Ces Annales*, 24.)
- BORREL et DE COULON : Action du glycogène et glycogène iodé sur les tumeurs greffées de la souris. (*Société de Biologie*, séance du 12 mai 1922, p. 1096.)
- BORREL, DE COULON et BOEZ : Action de différents métaux (spécialement du plomb) sur les tumeurs greffées de rats par l'ionothérapie. (*Société de Biologie*, séance du 25 novembre 1922, p. 1119.)
- BORREL, BOEZ et DE COULON : Cancer du goudron chez la souris. (*Société de Biologie*, séance du 17 février 1923, p. 402.)
- BORREL : Cultures cellulaires étalées dans un plan unique en couche mince, sur paroi de verre. (*Société de Biologie*, 94, 1926, p. 364.)
- BORREL : Eléments intra-cellulaires dans le sarcome. (*Société de Biologie*, 9 avril 1910, p. 584.)
- BORREL : Cytologie du sarcome de Peyton Rous et substance spécifique. (*Société de Biologie*, 94, 1926, p. 506.)
- BORREL : Technique simple pour la culture de tissus normaux ou de cellules cancéreuses. (*Société de Biologie*, 95, 1926, p. 96.)
- BORREL : Etiologie vermineuse de certains cancers. (*Bulletin de l'Association Française du Cancer*, tome XVI, n° 2, février 1927.)

Travaux sur la péripneumonie.

- BORREL, ROUX et NOCARD : Le microbe de la péripneumonie. (*Ces Annales*, 1898.)
- BORREL, DUJARDIN-BEAUMETZ, JEANTET et JOUEN : Le microbe de la péripneumonie. *Ces Annales*, 24, 1910, p. 168.

Travaux sur les spirilles.

- BORREL et MARCHOUX : Argas et spirilles. (*Société de Biologie*, 23 février 1905.)
- BORREL : Cils et division transversale chez le spirille de la poule. (*Société de Biologie*, janvier 1906.)
- BORREL et BURNET : Procédé de diagnostic rapide des lésions syphilitiques. (*Société de Biologie*, janvier 1907.)

- BORREL et BURNET : Développement initial *in vitro* du spirille de la poule. (*Société de Biologie*, mars 1906.)
- BORREL et CERNOVODEANU : Membrane ondulante chez le spirochète Balbani. (*Société de Biologie*, juin 1907.)

Travaux sur la clavelée.

- BORREL : Expériences sur la filtration du virus claveleux. (*Société de Biologie*, 18 janvier 1902.)
- BORREL : Microbes filtrants des eaux et culture d'un protozoaire animal. (*Société de Biologie*, 18 janvier 1902.)
- BORREL : Virus claveleux dans la mamelle des brebis en lactation. (*Société de Biologie*, mars 1902.)
- BORREL : Sérum anticlaveleux. (*Société de Biologie*, 20 juillet 1902.)
- BORREL : Etude expérimentale de la clavelée. Filtration du virus. Séroclavélisation. Sérothérapie. (*Ces Annales*, janvier 1923.)
- BORREL : Etudes sur la clavelée. (*Ces Annales*, novembre 1903.)

Travaux sur le système pigmentaire.

- BORREL : Cellules pigmentaires et associations cellulaires. *Société de Biologie*, 4, séance du 7 juin 1913, p. 1215.)
- BORREL : Réseau fondamental pigmentaire chez *Alytes obstetricans* et apparition de cellules pigmentaires. (*Société de Biologie*, 19 juillet 1913.)
- BORREL : A propos du système pigmentaire chez *Alytes obstetricans*. (*Société de Biologie*, 26 juillet 1913.)
- BORREL : Réseau pigmentaire chez *Hemopsis sanguisuga*. (*Société de Biologie*, 25 avril 1914.)
- BORREL : Analogie de la formation sous-basale de M. Nageotte et du réseau fondamental pigmentaire. (*Société de Biologie*, 6 juin 1914.)
- BORREL : Remarques à propos des communications de MM. Nageotte et Prenant. (*Société de Biologie*, 13 juin 1914.)
- BORREL : A propos du plan pigmentaire. (*Bulletin de l'Association Française du Cancer*, 1914.)

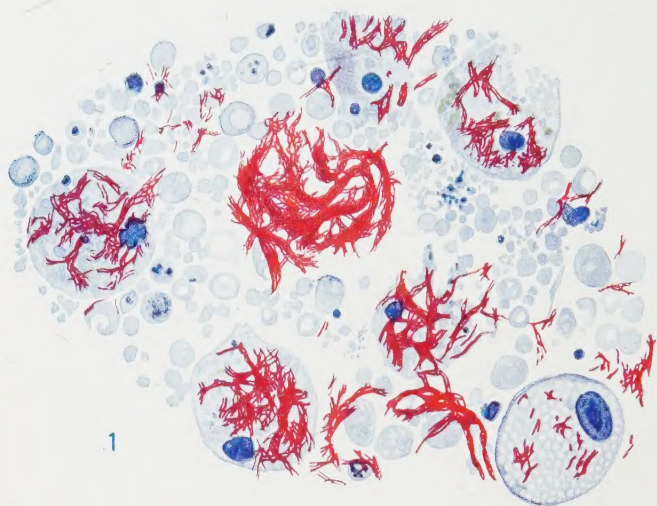
Virus filtrants.

- BORREL : *Molluscum contagiosum*. (*Bulletin de la Société Française de Dermatologie*, 1921, p. 29-31.)
- BORREL : Virus vaccinal dans la cornée du lapin. (*Société de Biologie*, 92, p. 348.)
- BORREL : Microbes dits invisibles et surcoloration. (*Société de Biologie*, séance du 18 décembre 1909, p. 774.)

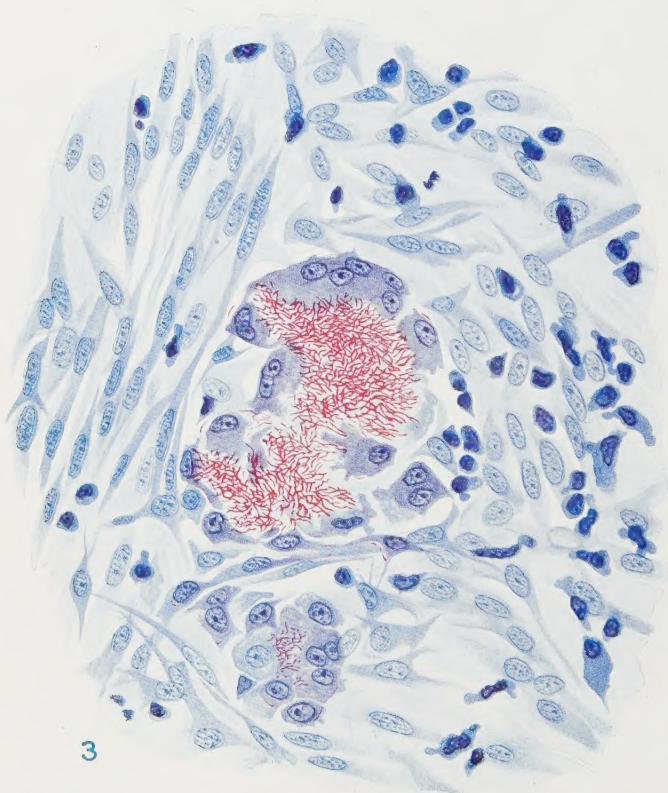
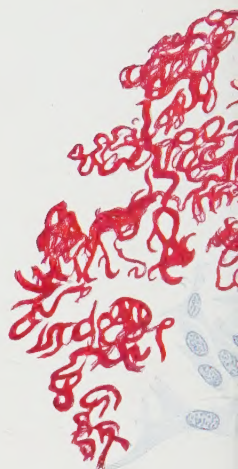
Travaux sur le goitre.

- BORREL, BOEZ et FREYSZ : Conditions étiologiques de l'endémie goitreuse à la Robertsau. (*Société de Biologie*, 92, 1923, p. 232 et 234.)

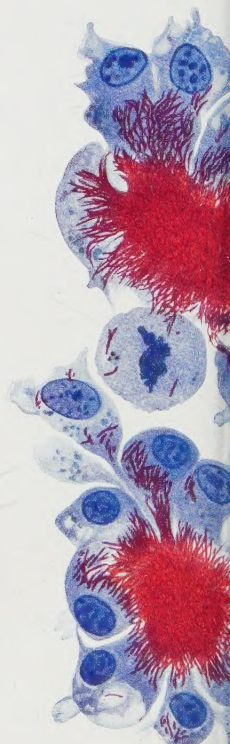
Le Gérant : G. MASSON.



1



3



4

